

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

Helen Hermann

miR-146a ja miR-146b roll psoriaasis ja keratinotsüütide proliferatsiooni regulatsioonis

Magistritöö

Juhendajad PhD Ana Rebane
 MSc Toomas Runnel
 Prof Toivo Maimets

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	7
1.1. MikroRNA-de mõiste ja biogenees	8
1.1.1 miRNA-de toimemehhanism.....	10
1.2. Naha ehitus ja homöostaas	11
1.2.1. Rakkude proliferatsioon	13
1.2.2. MikroRNA-de funktsioon nahas proliferatsiooni reguleerimisel.....	14
1.3. miR-146a/b funktsioon	15
1.3.1. miR-146a/b funktsioon nahas ja keratinotsüütides.	16
1.4. Kindlin-1 (FERMT1) ja tema funktsioon	17
1.5. Psoriaas ja selle kliinilised tunnused	18
1.5.1. Psoriaasi patogeneesi molekulaarsed mehhanismid.....	19
1.5.2. Psoriaasi geneetiline taust	21
1.5.3. miRNA-de roll psoriaasis.....	23
2. EKSPERIMENTAALOSA	25
2.1. Töö eesmärgid.....	25
2.2. Materjal ja meetodika	25
2.2.1. Töös uuritud indiviidid.....	25
2.2.2. Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine	26
2.2.3. Inimese primaarsete keratinotsüütide stimuleerimine tsütokiinidega	27
2.2.4. Inimese primaarsete keratinotsüütide transfekteerimine.....	27
2.2.5. RNA eraldamine.....	28
2.2.5.1. Inimese primaarsetest keratinotsüütidest RNA eraldamine.....	28
2.2.5.2. Naha proovidest RNA eraldamine.....	29
2.2.6. RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks	29

2.2.7. RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks.....	30
2.2.8. Eluvõime katse	32
2.2.9. Inimese primaarsete keratinotsüütide proliferatsiooni kiiruse hindamine loendamise abil	32
2.2.10. Rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetrial	32
2.2.11. SDS-PAGE ja Western blotting	33
2.2.12. Immunofluorestsentsanalüüs	34
2.2.13. Statistiline analüüs.....	35
2.3. TULEMUSED	36
2.3.1. miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioon psoriaasi patsientide nahas	36
2.3.2. Psoriaasis oluliste tsütokiinide mõju miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotüütides.....	37
2.3.3. Kindlin-1 ekspressioon ja paiknemine nahas.....	38
2.3.4. miR-146a/b mõju keratinotsüütide eluvõimele ja proliferatsioonile.....	40
2.3.5. Rakutsükli analüüs	41
2.3.6. Kindlin-1 on miR-146a/b oletatav märklaudgeen.....	42
2.4. ARUTELU JA JÄRELDUSED	44
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY	50
TÄNUSÕNAD	51
KASUTATUD KIRJANDUS	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	65
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	66

KASUTATUD LÜHENDID

AGO – Argonaut (*Argonaute*)

APC – antigeeni esitlev rakk (*Antigen-presenting cell*)

CAF1 – *Chromatin assembly factor 1*

CARD10 – *Caspase recruitment domain-containing protein 10*

CARM1 – *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*

CCHCR1 – *Coiled coil α -helical rod protein 1*

CCR – C-C kemokiini retseptor (*C-C chemokine receptor*)

CDK – tsükliin-sõltuv kinaas (*Cyclin dependent kinase*)

CDSN – *Corneodesmosin*

CIP – tsükliin sõltuvate kinaasidega interakteeruv valk (*CDK-interacting protein*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool dihidrokloriid (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DCP2 – *Decapping mRNA 2*

DGCR8 – *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*

E2F – Transkriptsioonifactor E2F (*Transcription factor E2F*)

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGFR – epidermaalse kasvufaktori retseptor (*Epidermal growth factor receptor*)

EXP5 – eksportiin-5 (*Exportin-5*)

FBS – veise loote seerum (*Fetal bovine serum*)

FERM – domeen (*Four.1, Ezrin, Radixin, Moesin*)

FERMT1 – *Fermitin family member 1*

GW182 – 182kDa glütsiin-trüptofaan valk (*Glycine-tryptophan protein of 182 kDa*)

GWAS – ülegenoomsed assotsiatsiooni uuringud (*Genome-wide association study*)

HLA – *Human leukocyte antigeen*

ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule 1*

IFN – interferoon (*Interferon*)

IL – interleukiin (*Interleukin*)

IL-17R – Interleukiin 17 retseptor (*Interleukin-17 receptor*)

INK4 – tsükliin sõltuvate kinaaside inhibiitor (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*)

IRAK1 – *IL-1 receptor-associated kinase 1*

JAK – Jaanuse kinaas (*Janus kinase*)

KIR retseptor – *Killer immunoglobulin like receptors*

KRT10- keratiin 10 (*Keratin 10*)

KS – Kindleri sündroomi (*Kindler syndrome*)

LCE – *Late cornified envelop*

LMP1 – Epstein-Barri viiruse integraalne membraanivalk (*Epstein -Barr virus latent membrane protein 1*)

LPS – lipopolüsahhariid (*Lipopolysaccharide*)

MAPK – mitogeeniga aktiveeritav kinaas (*Mitogen-activated protein kinase*)

miR-146a ja miR-146b – miR-146a/b

NF-κB – tuumafaktor κB (*Nuclear factor kappa B*)

NK rakk – loomulik tapjarakk (*Natural Killer*)

NOT1-5 – *Negative on TATA 1-5*

p63 – *Tumor protein 63*

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*Phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehüüd (*Paraformaldehyde*)

Plk-1 – *Polo-like kinase 1*

PSORS1 – psoriaasi vastuvõtlikkuse regioon üks (*Psoriasis susceptibility region 1*)

RAN – *Ras-related nuclear protein*

RB – retinoblastoomi valk (*Retinoblastoma protein*)

RelB – transkriptsioonifaktor RelB (*Transcription factor RelB*)

RISC – RNA-indutseeritud vaigistav kompleks (*RNA-induced silencing complex*)

RUNX3 – *Runt-related transcription factor 3*

SDS – naatrium-dodetsüül-sulfaat (*Sodium dodecyle sulfate*)

SDS-PAGE – SDS-polüakrüülamiid-geelelektroforees (*Polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEM – standardviga (*Standard Error of the Mean*)

SNP – üksiku nukleotiidi polümorfism (*Single nucleotide polymorphisms*)

SOCS – tsütokiinide signalseerimise inhibiitor (*Suppressor of cytokine signaling*)

STAT – *Signal transducer and activator of transcription*

STK40 – seriin/treoniin kinaas 40 (*Serine/threonine kinase 40*)

ZC3H12C – *Zinc finger CCH domain-containing protein 12C*

TAGAP – *T-cell activation Rho GTPase-activating protein*

TGF-β – *Transforming growth factor beta*

Th – abistaja T-lümfotsüüt (*T helper cell*)

TLR – Tolli-laadne retseptor (*Toll-like receptor*)

TNFR – *Tumor necrosis factor receptor*

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*

TRAF6 – *TNF receptor-associated factor 6*

T-rakk – T-lümfotsüüt

UTR – transleerimata piirkond (*Untranslated region*)

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion protein 1*

SISSEJUHATUS

Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus, mille esinemissagedus Põhja-Euroopa päritolu inimeste seas on 3-5%. Haigusel on tugev geneetiline taust. Iseloomulikeks tunnusteks on immuunrakkude liikumine epidermisesse, tugev põletik, keratinotsüütide hüperproliferatsioon ja häired diferentseerumises (Parisi *et al.*, 2013; Smith, 2006; Lowes *et al.*, 2007). Haiguse tekke mehhanismides ei ole lõplikult selgusele jõutud. Üldiselt peetakse psoriaasi T-lümfotsüütide poolt vahendatud autoimmuunseks haiguseks. Psoriaasi patsientide veres ja löövetes on tervete inimestega võrreldes rohkem tüstotoksilisi T-lümfotsüüte (T-rakke), esimest tüüpi abistaja T-lümfotsüüte (Th1 – *T helper 1 cell*), Th17 ja Th22 tüüpi rakke (Friedrich *et al.*, 2000; Kagami *et al.*, 2010). Nende rakkude poolt toodetud tsütokiinid põhjustavad osa psoriaasile omastest sümptomitest (Li *et al.*, 2014). Lisaks suudavad Th1, Th17 ja Th22 rakkude poolt toodetud tsütokiinid esile kutsuda paljude põletikku võimendavate geenide ekspressiooni keratinotsüütides ja seeläbi raskendada haiguse kulgu (Nogales *et al.*, 2008).

MikroRNA-d on 21-24 nukleotiidi pikkused üheaahelalised endogeensed mittekodeerivad RNA-d, mis seondudes märklaudgeenidele reguleerivad geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt (Lau *et al.*, 2001). miRNA-d osalus on vajalik paljudes organismis toimuvates protsessides alates rakkude diferentseerumisest kuni üksikute organite ja kudede arenguni ja nende funktsioneerimiseni (Lal *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2008). Ühel miRNA-l on üldiselt mitu erinevat sihtmärkgeeni rakus ja sellest tulenevalt on neil ka mitmeid erinevaid funktsioone. miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) kõrgeenenud ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises nahas tuvastati Sonkoly jt poolt 2007 aastal. Üldiselt on teada, et miR-146a/b on NF-κB signaalraja negatiivsed regulaatorid ja läbi selle suruvad alla liigset põletikulist vastust (Taganov *et al.*, 2006).

Antud magistritöö eesmärgiks oli kirjeldada miR-146a/b ekspressiooni regulatsiooni ja funktsioone keratinotsüütides seoses psoriaasiga. Eksperimentaalosa täpsemad eesmärgid olid analüüsida miR-146a/b ja tema ennustatud sihtmärgi, Kindin-1, ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelises nahas, uurida miR-146a/b mõju inimese primaarsete keratinotsüütide proliferaatsioonile ja analüüsida, kas miR-146a/b inhibeerivad Kindlin-1 ekspressiooni keratinotsüütides.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. MikroRNA-de mõiste ja biogenees

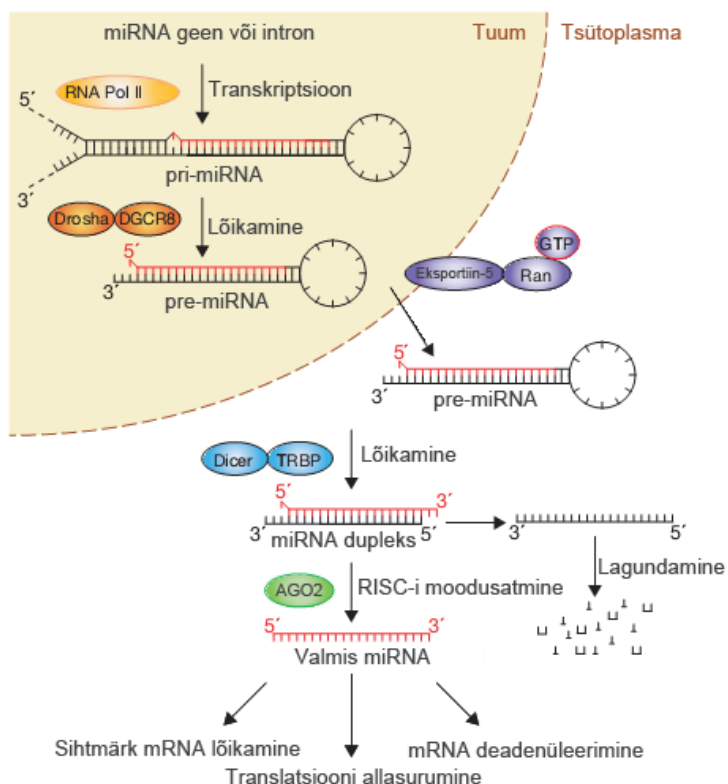
MikroRNA-d (miRNA-d) on 21-24 nukleotiidi pikkused üheaahelised endogeensed mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt (Lau *et al.*, 2001). Inimese rakkudes on tuvastatud üle 2500 miRNA¹ ning nad kontrollivad mitmeid arengu ja rakkudega toimuvaid protsesse näiteks nagu proliferatsioon, apoptoos ja diferentseerumine (Lal *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2008). Nii arvutuslike ennustuste abil kui ka eksperimentaalselt on näidatud, et iga loomne miRNA võib reguleerida sadu erinevaid mRNA-sid, tänu millele on suur osa transkriptoomist miRNA-de poolt mõjutatud, arvatakse, et ligikaudu 50% inimestes (Bartel, 2009; Voinnet, 2009). MikroRNA-de peamiseks toimemehhanismiks on seondumine komplementaarsuse alusel oma sihtmärkjärjestustega, mis põhjustab vastava mRNA lagunemist või translatsiooni inhibeerimist miRNA-dega seonduvate valkude poolt (Ipsaro ja Joshua-Tor, 2015).

MikroRNA-d transkribeeritakse iseseisvatelt geenidelt, valke kodeerivate annoteeritud geenide sees matriitsahelalt või intronitest (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Valke mittekodeerivatel genoomi aladel asuvatel miRNA geenidel on tavaliselt enda promootor, mis teeb neist iseseisvad transkriptsiooniüksused. Samuti võivad miRNA-d klasterduda ja olla transkribeeritud ühe pika primaarse miRNA transkriptina (Rodriguez *et al.*, 2004). Kõiki esmaseid miRNA transkripte nimetatakse pri-miRNA-deks ning nad on tüüpiliselt RNA polümeraas II transkriptid, millele lisatakse 5' otsa metüülguanosiinmüts ja 3' otsa polüA saba (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Kõikidele miRNA geenidele on iseloomulik, et nende RNA primaarsed transkriptid moodustavad juuksenõela-taolisi struktuure. Sellisel struktuuril on 33-35 nukleotiidi pikkune tüvi, terminaalne ling ja üheaahelised RNA segmendid 3' ja 5' otsas. Üks pri-miRNA on keskmiselt 1000 nukleotiidi pikkune (Joonis 1) (Lee *et al.*, 2003).

Samaaegselt transkriptsiooniga lõikab mikroprotsessor-kompleks transkribeeritavast pri-miRNA-st välja 65 nukleotiidi pikkuse prekursor miRNA (pre-miRNA) (Lee *et al.*, 2003). Mikroprotsessor-kompleksi moodustavad tuumas paiknev RNAas III tüüpi ensüüm Drosha ja tema kofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*), mis stabiliseerib Drosha

¹ http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa

seondumist pri-miRNA-ga ning määrab ensüümile kindla lõikesaidi (Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Droshal endal on kahahelalist RNA-d lõikav RNAasi-domeen, mis lõikab pri-miRNA 5' ja 3' õlga. Lõikesait on 11 aluspaari kaugusel juuksenõel-struktuuri tüveosa allosast (Han *et al.*, 2004).



Joonis 1. Üldine mikroRNA-de biogeneesi rada. miRNA-sid kodeerivad transkriptid (pri-miRNA) transkribeeritakse RNA polümeraas II poolt. Edasi lõigatakse primaarsed produktid Drosha-DGCR8 kompleksi poolt lühemateks pre-miRNA-deks, mis transporditakse Eksportiin-5 vahendusel tuumast tsütoplasmasse, kus lõigatakse Diceri poolt terminaalne ling pre-miRNA küljest ära ja tekib miRNA dupleks. Valmis miRNA AGO2 valguga liitumisel moodustub RISC kompleks, mille seondumine sihtmärk-mRNA-le põhjustab translatsiooni inhibeerimist, mRNA deadenüleerimist ning harvadel juhtudel sihtmärk-mRNA lõikamist. Modifitseeritud Winter *et al.*, 2009 järgi.

Väljalõigatud pre-miRNA transporditakse Eksportiin-5 (EXP5) vahendusel tuumast tsütoplasmasse, kus miRNA töötlemine viiakse lõpule (Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004). EXP5 tunneb ära kaksikahelalise pre-miRNA ligikaudu 14 nukleotiidi pikkuse tüve. Sellest tulenevalt eksporditakse tsütoplasmasse ainult kindla pikkusega ehk õigesti lõigatud pre-miRNA-d (Gwizdek *et al.*, 2002; Zeng ja Cullen, 2004). EXP5 moodustab kompleksi GTP-d siduva tuumas paikneva valguga RAN (*Ras-related nuclear protein*) ja transporditava pre-miRNA-ga (Bohnsack, 2004; Yi

et al., 2003). Pärast translokalisatsiooni läbi tuuma poori, põhjustab GTP hüdrolyüs kompleksi lagunemise ja pre-miRNA vabaneb tsütoplasmasse (Okada *et al.*, 2009).

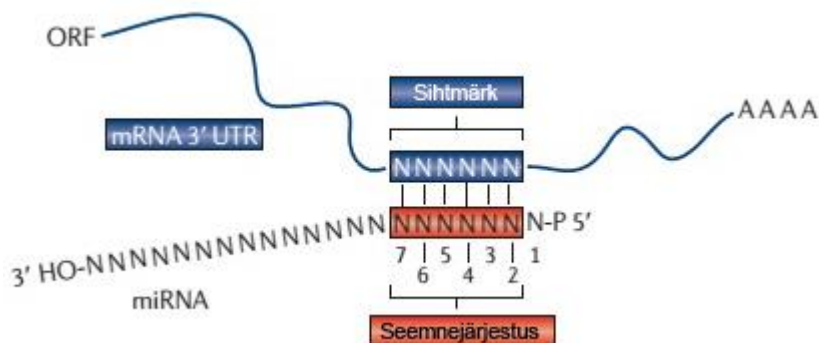
Tsütoplasmas seondub pre-miRNA-ga esmalt RNAas III tüüpi ensüüm Dicer, mille ülesandeks on valmistada 21-24 nukleotiidi pikkuseid miRNA duplekse (Bernstein *et al.*, 2001; MacRae *et al.*, 2006). Dicer seondub pre-miRNA 5' fosforüleeritud otsale ja lõikab sellest ~22 nukleotiidi kauguselt (Park *et al.*, 2011). Pre-miRNA terminaalne ling ja tüvi mõjutavad Diceri lõikamise aktiivsust: liiga pikk või lühike tüvi ning suur terminaalne ling aeglustavad pre-miRNA töötlemist (Zhang ja Zeng, 2010). Pärast lõikamist Dicer vabaneb miRNA dupleksist ja miRNA dupleks seondub ühega neljast Argonaut perekonna valkudest, kõige sagedamini Argonaut-2 (AGO2) valguga. AGO2 valgule laadimise etapis toimub primaarse ahela valik, mis sõltub miRNA duplexi 5'otsas oleva järjestuse termodünaamilisel stabiilsusest (Khvorova, Reynolds ja Jayasena, 2003). Ahel, millel on teisest ebastabiilsem 5' ots, valitakse enamasti primaarseks ahelaks ja üleliigne miRNA ahel suunatakse lagundamisele (Hu *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2003).

Üleliigse miRNA ahela eemaldamisega valmib RNA-indutseeritud vaigistav kompleks (RISC – *RNA-induced silencing complex*) (Hammond *et al.*, 2001; Diederichs ja Haber, 2007). Üheahelalise küpse miRNA funktsiooniks on juhtida aktiivne RISC oma sihtmärk mRNA-ni (Robb ja Rana, 2007). RISC-i peamine funktsionaalne valk on AGO2, teine oluline komponent on 182 kDa glütsiin-trüptofaan valk (GW182 – *glycine-tryptophan protein of 182 kDa*), mis interakteerub AGO2 ja vahendab mRNA deadenüleerimist (Krol *et al.*, 2010). AGO2-l on ka nukleasne aktiivsus ja võime lõigata mRNA-d, kuid ainult miRNA-mRNA 100%-se komplementaarsuse korral (Huntzinger ja Izaurralde, 2011).

1.1.1 miRNA-de toimemehhanism

Üks miRNA suudab reguleerida rohkem kui ühe sihtmärk mRNA ekspressiooni ning samuti võib ühe mRNA tase rakus olla kontrollitud mitme erineva miRNA-ga. Enamik loomseid miRNA-sid seonduvad sihtmärk mRNA 3' mittetransleeritud piirkonnale (UTR – *Untranslated Region*) mittetäielikult komplementaarsuse alusel ehk nn miRNA seemnejärjestuse (*seed sequence*) abil, mis algab teisest nukleotiidist alates miRNA 5' otsast ja on tavaliselt 6-8 nukleotiidi pikkune

(Joonis 2) (Lewis *et al.*, 2005; Lai, 2002). Pikema seemnejärjestuse ja lisakomplementaarsuse olemasolul on reeglina miRNA mõju mRNA ekspressioonile tugevam (Grimson *et al.*, 2007).



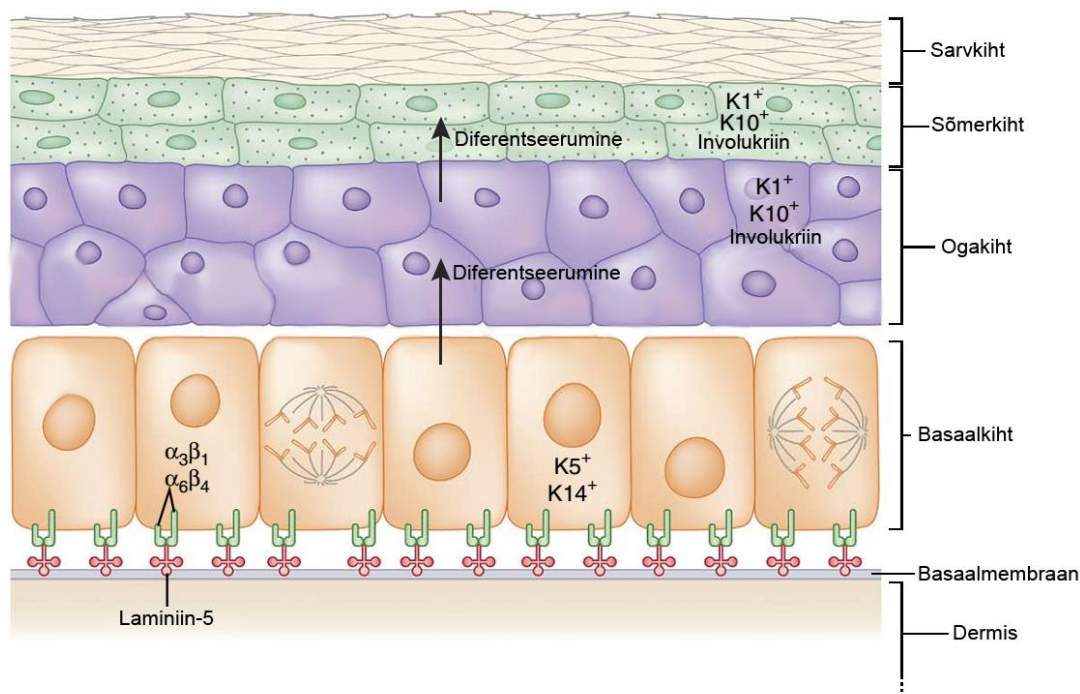
Joonis 2. miRNA seondumine oma sihtmärkjärjestusega. miRNA-d seonduvad osalise komplementaarsuse abil oma sihtmärkidega mRNA-ga 3' UTR alas. mRNA-ga seondub miRNA 5' osa, kus asub seemnejärjestus, üldiselt nukleotiidid 2-7. Modifitseeritud Huntzinger ja Izaurralde, 2011 järgi.

Loomset päritolu miRNA-de puhul on näidatud nelja erinevat viisi geeniekspressiooni allasurumiseks: sihtmärk mRNA lagundamine, translatsiooni alustamise inhibeerimine, translatsiooni elongatsiooni häirimine ja translatsiooni enneaegne lõpetamine (Wu ja Belasco, 2008; Eulalio *et al.*, 2008; Filipowicz *et al.*, 2008). Nii translatsiooni inhibeerimise kui ka mRNA lagundamise puhul toimub esmalt mRNA deadenüleerimine, mida viib läbi CAF1–CCR4–NOT deadenülaasi kompleks, mis koosneb valkudest CCR4 (*C-C chemokine receptor type 4*), CAF1 (*Chromatin assembly factor 1*) ja NOT1 kuni NOT5 (*Negative on TATA 1-5*) (Piao *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 1999). mRNA lagundamise korral eemaldab DCP2 (*Decapping mRNA 2*) ensüüm metüülguanosiinmütsi, mis viib transkripti 5'-3' suunalise eksonukleaasse lagundamiseni (Behm-Ansmant *et al.*, 2006). MikroRNA-de eluiga rakkudes on tavaliselt paar päeva (Bail *et al.*, 2010).

1.2. Naha ehitus ja homöostaas

Imetajate nahk jaguneb dermiseks ja kihistunud epidermiseks. Epidermise moodustavad 95% ulatuses erinevates diferentseerumise astmetes olevad keratinotsüüdid. Kõige sügavamal epidermises paikneb ühe rakukihi paksune basaalkiht, mis koosneb proliferatsioonivõimelistest diferentseerumata keratinotsüütidest. Nende jagunemisel uuendatakse basaalkihti ja pannakse alus mitte-prolifereervatele kuid transkriptsiooniliselt aktiivsetele oga- ja granulaarkihitidele ning terminaalset diferentseerunud sarvkihile, kus rakud on tuuma kaotanud (Joonis 3) (Vasioukhin *et*

al., 1999). Basaalkihi all asub ekstratsellulaarne maatriks, mis eraldab dermist epidermisest. Basaalsed rakud kinnituvad integriinide nimeliste retseptorite abil maatriksi külge (Jones ja Watt, 1993; Jensen, Lowell ja Watt, 1999).



Joonis 3. Epidermise ehitus. Epidermis on kihilise struktuuriga, koosnedes neljast erinevast kihist: basaalkiht, ogakiht, sõmerkiht ja sarvkiht. Basaalkihis on proliferatsioonivõimelised rakud, mis kinnituvad integriinide $\alpha_3\beta_1$ ja $\alpha_6\beta_4$ vahendusel baasaalmembraani maatriksi komponendi laminiin-5 külge. Vähediferentseerunud keratinotsüütides on ekspresseerunud Keratin 5 ja 14 (K5 ja K14). Basaalkihi keratinotsüütide diferentseerudes kaotavad nad osa oma proliferatsioonivõimest ja neis ekspresseeruvad Keratiin 1 ja 10 (K1 ja K10) ja Involukriin. Sarvkihi rakkudel ehk kõige pindmise kihi rakkudel puudub tuum ja lõpuks kooruvad surnud rakud naha pinnalt. Modifitseeritud Hsu, Li ja Fuchs, 2014 järgi.

Integriinide funktsiooni on uuritud ka loomamudelites, kus näidati et β_1 integriini deleteerimine hiires häirib basaalmembraani moodustamist ja keratinotsüütide proliferatsiooni (Raghavan *et al.*, 2000). Epiteelkoe rakkude jagunemine on häiritud kuna integriinid on tuumas seotud mikrotuubulite ja mitoosikäävi moodustamisega ning häired integriinide signaliseerimises põhjustavad valesuunaliste mitoosikäävide moodustamist (Reverte *et al.*, 2006). Naha rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumise korrektseks toimumiseks läheb nahas vaja nii keratinotsüütidest kui ka ümbritsevast keskkonnast tulenevaid signaale.

Nahk on füüsiline barjäär, mis kaitseb organismi väliskeskkonna mõjude eest ja kus toimub esmane kokkupuude patogeenidega ja seetõttu on vaja mehhanisme nendega võitlemiseks (Viswanathan ja Hecht, 2000). Epiteelkoe rakkudel on patogeenide pinnastruktuure ära tundvad retseptorid, nagu näiteks Tolli-laadsed retseptorid (TLR – *Toll-like receptor*) (Medzhitov *et al.*, 1997). Immuunvastuse toimumiseks on vajalikud interaktsioonid keratinotsüütide ja nahas paiknevate immuunrakkude vahel, millest olulistemaks on Langerhansi rakud ja epidermises paiknevad T-rakud. Lisaks neile paiknevad nahas makrofaagid, nuumrakud ja väike populatsioon kaasasündinud immuunsüsteemi lümfoidseid rakke, mis samuti aitavad kujundada immuunvastust nahas (Pasparakis *et al.*, 2014). Patogeeni äratundmisel aktiveeritakse tuumafaktor κB (NF- κB – *Nuclear factor kappa B*) ja MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) signaalrajad (Arbibe *et al.*, 2000; Miller, 2008). Need omakorda indutseerivad mitmete adhesioonimolekulide, tsütokiinide, kemokiinide ja antimikroobsete peptiidide ekspressiooni, põhjustades kaasasündinud immuunvastuse tugevnemist epiteelkudedes mikroobide infektsioonile (Brightbill *et al.*, 1999).

1.2.1. Rakkude proliferatsioon

Naha ja teiste kudede homöostaasiks on vajalik rakkude proliferatsiooni täpne kontroll. Oluline osa proliferatsiooni reguleerimisel on rakutsükli, millel on neli erinevat faasi: G1, S, G2 ja M. Tavaliselt limiteerib proliferatsiooni kiirust G1-faas, mille raames on vaja initsieerida mitmeid sündmusi, et toimuks rakutsükli edasine läbimine (Sherr, 1993). Rakutsükli reguleeritakse tsükliin-sõltuvate kinaaside (CDK – *Cyclin Dependent Kinase*) perekonna valkude poolt, mille aktiivsust omakorda kontrollivad tsükliinid. Tsükliinid soodustavad rakutsükli läbimist sellega, et aktiveerivad või inaktiveerivad valke, millel on roll erinevates rakutsükli protsessides (Morgan, 1997; Tyers ja Jorgensen, 2000; Breeden, 2003).

Mitteprolifereeruvad rakud on peatatud kõige sagedamini G0-faasis. Peale rakutsükli läbimist soodustavate signaalide saamist väljub rakk G0-faasist ja liigub edasi G1-faasi. Järgnevalt seondub tsükliin D CDK4/6-le ning toimub pRB (RB – *Retinoblastoma protein*) perekonna valkude osaline inaktiveerimine, mis põhjustab transkriptsioonifaktori E2F (*E2F – Transcription factor E2F*) sõltuvate geenide transkriptsiooni. Üheks varajaseks transkribeeritavaks geeniks on tsükliin E1, mis suudab seonduda CDK2-ga ning see viib pRB valgu täielikule inaktiveerimisele. Tänu sellele suudavad rakud edasi liikuda S-faasi, kus omakorda tsükliin A seondub CDK2-ga ning see

interaktsioon põhjustab DNA sünteesiga seotud valkude aktiveerimist. Interfaasis tuuma membraani lagunemise tulemusena saavad tsükliin B ja CDK1 seonduda ning see põhjustab rakkude edasiliikumise M-faasi, kus toimub rakkude jagunemine (Malumbres ja Barbacid, 2001). Rakutsükli korrektne läbimine on rakkude proliferatsiooni eelduseks ning vead selles inhibeerivad rakkude jagunemist või viivad vähi tekkeni.

1.2.2. MikroRNA-de funktsioon nahas proliferatsiooni reguleerimisel

Rakkude kontrollitud jagunemine epidermises tagab naha kaitsebarjääri tervikkuse. Liiga kiire või aeglane nahas olevate keratinotsüütide proliferatsioon võib viia mitmete haiguste väljakujunemiseni, kuna ei suudeta tagada naha korrektset funktsiooni. miRNA-de sihtmärkide seas on palju rakutsükli regulaatorgeene. Nii suudavad erinevad miRNA-d rakutsükli läbimist kiirendada või pidurdada ning seeläbi mõjutada rakkude proliferatsiooni. Rakkude jagunemist inhibeerivad miRNA-d suruvad tihti otseselt alla CDK-sid (miR-16 perekond), erinevaid tsükliine (miR-15 ja miR-26a) või E2F perekonna liikmeid (miR-34, miR-93) (Bueno *et al.*, 2008; Liang ja He, 2011). Proliferatsiooni soodustavatel miRNA-del on enamasti mõju pRB valgule (miR-106a) või rakutsükli inhibiitoritele INK4 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*) ja CIP (*CDK-interacting protein*) valkude perekondadest (Bueno *et al.*, 2008; Sherr ja Roberts, 1999). Esimene miRNA, millel leiti roll epidermise diferentseerumises ja proliferatsioonis oli miR-203, mille ekspressioon indutseeritakse kohe kui keratinotsüütid hakkavad diferentseeruma. miR-203 funktsiooniks epidermises on soodustada rakkude väljumist rakutsüklist ja läbi selle takistab ta edasist keratinotsüütide proliferatsiooni (Lena *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2013). Vastupidise rolliga mikroRNA nahas on miR-125b, mis soodustab epidermise basaalkihi rakkude ja karvafolliikuli tüvirakkude paljunemist ning nende populatsioonide püsimist (Zhang *et al.*, 2011). Lisaks nende rollile proliferatsioonis ja diferentseerumises reguleerivad miRNA-d nii immuunrakkudes kui ka keratinotsüütides erinevate põletikuliste tsütokiinide tootmist ja omavad olulisi funktsioone immuunvastuse kujunemises ja kontrollimisel nahas (Sonkoly *et al.*, 2008; Yi ja Fuchs, 2009).

1.3. miR-146a/b funktsioon

Inimestes kuulub mikroRNA miR-146 perekonda kaks liiget miR-146a (hsa-miR-146a-5p) ja miR-146b (hsa-miR-146b-5p) ning neid transkribeeritakse vastavalt viiendalt ja kümnendalt kromosoomilt. miR-146a/b erinevad teineteisest kahe nukleotiidi võrra miRNA 3' regioonis (Joonis 4). Mõlemad miRNA-d osalevad kaasasündinud immuunsüsteemi reageerimisel patogeenidele, mida näidati esimest korda inimese monotsüütide rakuliinis THP-1 (Taganov *et al.*, 2006).

miR-146a 5'-UGAGAAACUGAAUCCAUGGGUU-3'
miR-146b 5'-UGAGAAACUGAAUCCAUAGGCU-3'

Joonis 4. miR-146a/b primaarjärjestused^{2,3}. Punasega on märgitud nukleotiidid, mis on erinevad miR-146a ja miR-146b järjestustes. Rohelisega on märgitud miRNA-de seemnejärjestus.

miR-146a ekspressioon on rakkudes indutseeritav läbi NF-κB-sõltuva mehhanismi vastusena paljudele immuunsüsteemi aktiveerijatele nagu lipopolüsahhariidid (LPS – *lipopolysaccharide*), Interleukiin-1β (IL – *Interleukin*), LMP1 (*Epstein -Barr virus latent membrane protein 1*) ja TNF-α (*Tumor necrosis factor alpha*). miR-146a inhibeerib otseselt paljusid NF-κB signaalraja olulisi liikmeid, näiteks IRAK1 (*IL-1 receptor-associated kinase 1*), TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), RelB ja CARD10 (*Caspase recruitment domain-containing protein 10*) ning tänu sellele surub alla põletikku soodustavate tsütokiinide liigset sünteesi paljudes erinevates rakutüüpides (Taganov *et al.*, 2006; Crone *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2008, Cameron *et al.*, 2007). Hiirtes avaldub miR-146a tugevamini immuunrakkudes, kus tema ekspressioon indutseeritakse rakkude lõplikul diferentseerumisel või aktivatsioonil (Boldin *et al.*, 2011). Lisaks on näidatud, et miR-146a^{-/-} hiirtel areneb 6-8 elukuul autoimmuunsus, mis on põhjustatud STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) liigsest aktiveerimisest regulatoorsetes T-lümfotsüütides, mis omakorda põhjustab suurenenud IFN-γ (IFN – *Interferon*) tootmise, mistõttu ei suudeta enam alla suruda Th1 tüüpi immuunvastust kudedes (Zhao *et al.*, 2011; Boldin *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2010).

² http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000449

³ http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003129

Vähemtuntud miR-146 perekonna liige on miR-146b, mille tase rakus sõltub JAK-STAT (JAK – *Janus kinase*) signaaliraja aktivatsioonist (Curtale *et al.*, 2013). STAT perekonna valgud on transkriptsiooni faktorid, mille aktivatsiooni ja liikumist tuuma reguleerivad nii pro-inflatoorsed tsütokiinid kui ka anti-inflammatoorne tsütokiin IL-10. Näiteks põhjustavad IL-6 ja IL-10 STAT3 aktivatsiooni ja liikumist tuuma ning IFN- γ põhjustab STAT1 liikumise tuuma (Xiang *et al.*, 2014; Darnell Jr., 1997). Oma funktsioonilt sarnaneb miR-146b miR-146a-le kuna neil on sama seemnejärjestus ja suuresti kattuvad sihtmärkgeenid. Näiteks inhibeerib ka miR-146b TRAF6 ning IRAK1 ekspressiooni ja surub seeläbi alla NF- κ B aktiivsust (Taganov *et al.*, 2006). Kõrgenenud miR-146b tase inhibeerib NF- κ B/IL-6 signaalirada, moodustades negatiivse tagasisideme miR-146b ja STAT3 signaaliraja vahel (Iliopoulos *et al.*, 2009; Hatziapostolou *et al.*, 2011). Lisaks põletikuvastastele funktsioonidele on miR-146b puhul pakutud välja vähivastast rolli (Xiang *et al.*, 2014). Glioomi rakuliinides on näidatud, et üheks peamiseks miR-146b funktsiooniks kasvajakudedes on EGFR allasurumine, läbi mille inhibeeritakse rakkude migratsiooni ja kudedesse invasiooni (Katakowski *et al.*, 2010).

1.3.1. miR-146a/b funktsioon nahas ja keratinotsüütides.

Nahal ei ole ainult kaitsebarjääri funktsioon meie organismis vaid nahka võib pidada üheks immuunsüsteemi osaks. Sellest tulenevalt omavad immuunsüsteemis olulised miRNA-d sageli ka nahas regulatiivseid funktsioone. Immuunrakkudes on mitmed signaalirajad miRNA-dega kontrollitud, mõjutades rakkude arengut ja fenotüüpi ja seeläbi reguleerides immuunvastust erinevates kudedes ning sama kehtib ka nahas olevate keratinotsüütide kohta. Kui aktiveerida keratinotsüüte läbi TLR2, reguleerib miR-146a paljude tsütokiinide ja kemokiinide tootmist läbi TRAF6 ja IRAK1 ekspressiooni inhibeerimise (Meisgen *et al.*, 2014). Lisaks on näidatud, et IFN- γ juuresolekul reguleerib miR-146a alla üle 400 geeni keratinotsüütides, mis viitab tema tugevale põletikuvastasele funktsioonile nahas. Kuna on tuvastatud kõrgenenud miR-146a ekspressioon nii atoopilise dermatiidi kui ka psoriaasi patsientide lööbelises nahas võib oletada, et miR-146a on üldine põletikulistes olukordades stimuleeritud miRNA, mille üks funktsioonidest on omakorda alla suruda ülemääraseid põletikulisi protsesse nii keratinotsüütides kui ka teistes naha rakkudes (Sonkoly *et al.*, 2007, Rebane *et al.*, 2014). Hiljuti tuvastati, et miR-146a võib omada ka muid rolle nahas. miR-146a suudab inhibeerida keratinotsüütide proliferatsiooni tänu sellele, et surub alla EGFR ekspressiooni, mis on teadaolevalt keratinotsüütide jagunemise positiivne regulaator (Zhang *et al.*, 2014).

Naha vananemise uurimiseks kasutatakse nn vananenud naha mudelit (*aged extrinsically*) mille puhul mõjutakse nahka UVA ja UVB kiirgusega. Selles mudelis erineb vananenud nahk bioloogiliselt (*aged intrinsically*) vananenud nahast selle poolest, et epidermis on paksem ning on muutunud keratinotsüütide diferentseerumine ja fibroblastide funktsionaalsus. Kuna UVA ja UVB kiiritatud dermise fibroblastides tuvastati madalam miR-146a ekspressioon, arvatakse, et miR-146a võib mängida rolli ka naha vananemises, kuid miR-146a täpne funktsioon selles protsessis on välja selgitamata (Li et al., 2013). miR-146b funktsiooni keratinotsüütides ja nahas ei ole varem uuritud.

1.4. Kindlin-1 (*FERMT1*) ja tema funktsioon

Inimese genoomis on olemas kolm Kindlin valku (Kindlin-1, -2 ja -3), neil on olemas FERM (*Four.1, Ezrin, Radixin, Moesin*) domeen ja plekstriini homoloogia domeen (*pleckstrin homology domain*), mis mõlemad vahendavad seondumist β -integriinidele ja erinevatele membraanivalkudele (Ma et al., 2008; Moser et al., 2008). *FERMT1* (*Fermitin family member 1*) geeni kodeeritud valk Kindlin-1 kuulub β -integriinide signalseerimise aktivaatorite perekonda (Larjava et al., 2008). Kindlin-1 on ekspresseerunud naha basaalkihi keratinotsüütides ja soolestiku epiteelis (Herz et al., 2006; Siegel et al., 2003). Nahas reguleerivad Kindlin valgud integriinide aktivatsiooni ning vahendavad läbi selle epidermise seondumist basaalmembraanile (Herz et al., 2006; Ussar et al., 2008).

Mutatsioonid *FERMT1* geenis põhjustavad Kindleri sündroomi (KS), mis on haruldane autosoomne retsessiivne nahahaigus (Jobard et al., 2003; Siegel et al., 2003). Haigusele on iseloomulik naha tundlikkus valgusele ja ulatuslik atroofia, vähenenud on rakkude proliferatsioon ning esinevad villid nahal (Lai-Cheong ja McGrath, 2010; Siegel et al., 2003). *In vitro* uuringud KS patsientidest pärinevate keratinotsüütidega näitasid, et rakkudel olid häirunud adhesioonivõime, suunatud migratsioon ja proliferatsioon (Herz et al., 2006; Lai-Cheong et al., 2009). Suur osa nendest defektidest tulenevad muutustest β -integriinidest sõltuvast signalseerimisest, mille tulemusena on häiritud paljude valkude kinnitumine raku tsütoskeletile (Lai-Cheong et al., 2009; Ussar et al., 2008; Has et al., 2009). Kindlin-1 puudumine keratinotsüütides põhjustab ka põletikku soodustavate tsütokiinide, maatriksi metalloproteasid ja

teiste ekstratsellulaarse maatriksi valkude üle tootmist, mis omakorda soodustab naha vananemist ja põletiku teket (Heinemann *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2012).

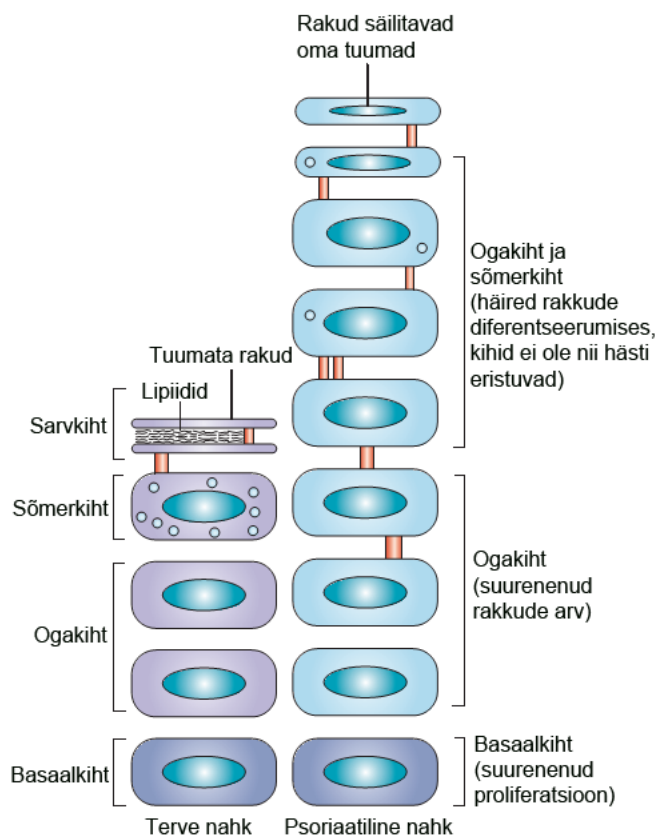
Kindlin-1 vähendamine siRNA-de vahendusel näitas, et ebanormaalsete mitoosikäävide arv suureneb ja tsentromeeride lahknemisel on defekte. Sellest tulenevalt järeldati, et Kindlin-1 kontrollib mitoosikäävi moodustamist läbi integriinide aktivatsiooni reguleerimise. Kindlin-1 enda aktiivsuse ja funktsiooni regulatsioon mitoosis toimub läbi Plk-1 (*Polo-like kinase 1*) sõltuva fosforüleerimise, mis on oluline normaalsete mitoosikäävide moodustamiseks. Kindlin-1 täpne roll tsentromeeride moodustamise reguleerimisel on veel teadmata, aga arvatakse, et ta funktsioneerib tugi- või adaptorvalguna aidates initseerida integriini seoseliste adhesiooni komplekside moodustamist (Patel *et al.*, 2013).

1.5. Psoriaas ja selle kliinilised tunnused

Psoriaas on immuunsüsteemiga seotud krooniline põletikuline nahahaigus, mis on maailmas keskmise esinemissagedusega 2-3% populatsioonist ning enim levinud Põhja-Euroopa päritolu inimeste seas (3-5%) (Parisi *et al.*, 2013; Smith, 2006; Lowes *et al.*, 2007). Haigus on multifaktoriaalne, olulised on interaktsioonid naha rakkude ja immuunsüsteemi vahel ning avaldumises mängivad rolli nii geneetilised- kui ka keskkonnafaktorid (Pittelkow, 2005). Psoriaasi iseloomulikeks tunnusteks on immuunrakkude infiltratsioon epidermisesse ning muutunud keratinotsüütide proliferatsiooni kiirus ja diferentseerumine (Smith, 2006; Lowes *et al.*, 2007).

Psoriaasil on mitu erinevat vormi, millest kõige levinum on krooniline naastuline psoriaas (*psoriasis vulgaris*), mille peamisteks nähtavateks sümptomiteks on punane põletikuline kindlalt piiritletavate laikudega kestendav lööve, mis tekib keratinotsüütide suurenenud proliferatsiooni tulemusena. Keratinotsüütide jagunemine võib psoriaasi lööbelises nahas olla kuni kaheksa korda kiirem kui normaalses nahas, mis põhjustab epidermise paksenemise ja muutusi keratinotsüütide diferentseerumises (Bata-Csorgo, 1993). Basaalkihi rakkude liikumine ülemistesse epidermise kihtidesse ja diferentseerumine sarvkihi rakkudeks võtab terves nahas aega neli kuni kuus nädalat, aga psoriaasis ainult paar päeva. Liiga kiire basaalsete keratinotsüütide proliferatsiooni ning migreerumise puhul ei jõua rakud lõplikult diferentseeruda – epidermises puudub küps granulaarkiht ning ülemistes kihtides säilivad keratinotsüütidel tuumad ja ei moodustu korrektset

sarvkihti (Joonis 5) (Mansbridge ja Knapp, 1987). Lisaks löövetele kaasneb psoriaasiga liigne angiogenees dermises, mille tõttu tekib epidermise alla tugev vaskulaarvõrgustik ning see omakorda annab löövetele iseloomuliku punase värvuse. Tänu suurenenud verevarustusele epidermise all infiltreerub rohkem immuunrakke nahka ning põletikulised protsessid kulgevad kiiremini (Parisi *et al.*, 2013).



Joonis 5. Erinevused psoriaasi lööbelise naha ja terve naha vahel. Terves nahas diferentseeruvad basaalkihi keratinotsüüdid ogakihihi rakkudeks, edasi sõmerkihi rakkudeks ning lõpuks kaotavad tuuma ja diferentseeruvad lõplikult sarvkihi rakkudeks. Psoriaatilises nahas on basaalkihi keratinotsüütidel suurenenud proliferatsioon, häirunud on rakkude lõplik diferentseerumine ja paljud sarvkihi rakud ei kaota oma tuumi. Modifitseeritud Bowcock ja Krueger, 2005 järgi.

1.5.1. Psoriaasi patogeneesi molekulaarsed mehhanismid

Praeguste teadmiste kohaselt peetakse psoriaasi T-lümfotsüütide poolt (T-rakkude) vahendatud autoimmuunseks haiguseks. Psoriaasi patsientide veres ja löövetes on tervete inimestega võrreldes rohkem tüstotoksilisi T-rakke, Th1, Th17 ja Th22 tüüpi rakke (Friedrich *et al.*, 2000; Kagami *et al.*, 2010). Tänu neile rakkudele on psoriaatikute nahas iseloomulik tsütokiinide profiil ja paljude

tsütokiinide ekspressioon on tavapärasest kõrgem. Osad psoriaasile omastest sümptomitest tulenevad tsütokiinide suurenenud hulgast (Li *et al.*, 2014). Näiteks on leitud, et Th1, Th17 ja Th22 rakkude poolt toodetud tsütokiinid suudavad keratinotsüütides esile kutsuda paljude põletikku võimendavate geenide ekspressiooni (Nograles *et al.*, 2008).

Th1 rakkudega seostatakse tsütokiine IFN- γ , IL-12 ja TNF- α (Austin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2000). T-rakud, mis toodavad peamiselt IL-17, kutsutakse Th17 rakkudeks (Weaver *et al.*, 2007; Steinman, 2007; Korn *et al.*, 2009). Th17 rakud ja nendega seonduvad tsütokiinid IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 ja IL-26, mängivad olulist rolli psoriaasis ning veel mitmetes kroonilistes autoimmuun- ja põletikulistes haigustes (Boniface *et al.*, 2007; Lowes *et al.*, 2008; Caruso *et al.*, 2009; Kagami *et al.*, 2010). Rakkude populatsiooni, mis ekspresseerib CCR10, CCR6 ja CCR4 ning toodab ainult IL-22, aga mitte IL-17 ega IFN- γ , kutsutakse Th22 rakkudeks (Trifari *et al.*, 2009; Duhon *et al.*, 2009). Th22 rakud on inimese nahale omased mälu T-rakud, mis osalevad naha immuunsuses, epidermise struktuursetes muutustes ning aitavad hoida naha homöostaasi (Eyerich *et al.*, 2009). Kõik nimetatud abistaja T-rakud osalevad psoriaasi patogeneesis vahendades ja võimendades immuunvastuseid, et luua kroonilise põletiku keskkond, mille tulemusena tekib ja säilib psoriaasi lööve (Cai, Fleming ja Yan, 2012).

Igal tsütokiinil on psoriaasi tekkes ja sümptomites oma kindel roll. Näitena võib tuua IL-1 perekonna liikmed, IL-1 α ja IL-1 β , mida leidub normaalses epidermises ning millest IL-1 β ekspressioon on psoriaasi patsientide nahas tõusnud (Kupper *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2014). IL-1 β suurendab adhesioonimolekulide ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) ja VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) ekspressiooni dermise rakkudes ning samuti soodustab trombotsüütide agregatsioonifaktori, lämmastikoksiidi ja prostaglandiini I₂ sekretsiooni, mis omakorda põhjustab suurenenud immuunrakkude kogunemist nahka (Natsuaki *et al.*, 2014). IL-1 β toimib keratinotsüütidele, lokaalselt paiknevatele fibroblastidele, vaskulaarsele endoteelile ja lümfotsüütidele nii autokriinselt kui ka parakriinselt (Mee *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2007).

Psoriaasis suurenenud IL-12 perekonna liikmete, IL-12B ja IL-23A, ekspressioon põhjustab tugevat Th1 ja Th17/Th22 tüüpi immuunvastuse teket (Cargill *et al.*, 2007). IL-12 indutseerib Th1 rakkudes IFN- γ tootmist ja soodustab T-mälurakkude liikumist nahka (Sigmundsdóttir *et al.*, 2004). IFN- γ tase on samuti psoriaasi löövetes kõrgeks tõusnud ning enamasti sekreteerivad seda

tsütokiini nahas olevad Th1 rakud (Gearing *et al.*, 1990; Kryczek *et al.*, 2008). IFN- γ aktiveerib müeloidseid antigeeni esitlevaid rakke (APC – *Antigen-presenting cell*), mis hakkavad tootma IL-1 β ja IL-23. Need kaks tsütokiini omakorda soodustavad psoriaasi löövetes IL-17 sekreteerivate rakkude arengut (Kryczek *et al.*, 2008). Tavaolukorras osaleb IL-17 organismi kaitses spetsiifiliste patogeenide vastu, stimuleerides antimikroobsete peptiidide, põletikku soodustavate tsütokiinide ja kemokiinide vabanemist rakkudest. Psoriaasis on IL-17 tase lööbelises nahas normaalsest kõrgem ning selle liigne hulk omakorda võimendab haiguse sümptomeid (Kryczek *et al.*, 2008; Zhu ja Qian, 2012).

Aktiveeritud T-rakkude ja APC rakkude poolt toodetav TNF- α stimuleerib psoriaasis IL-23/Th17 telge. TNF- α koostöös IL-17-ga suudab oluliselt mõjutada keratinotsüütide geeniekspressiooni ja põletikku soodustavate valkude sünteesi (Johnston *et al.*, 2013; Chiricozzi *et al.*, 2011). TNF- α mõjul suureneb IL-17R (*Interleukin-17 receptor*) ekspressioon keratinotsüütides, mistõttu tugevneb IL-17A efekt. IL-17A omakorda indutseerib TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*) ekspressiooni (Johnston *et al.*, 2014; Hartupée *et al.*, 2007). Üheks efektiivsemaks psoriaasi raviks ongi tänapäeval bioloogilised ravimid: TNF- α vastased antikehad (infliximab, adalimumab ja etanercept) või IL-17 signaliseerimise allasurumine antikehadega (ixekizumab, secukinumab) või tema retseptori IL-17R inhibeerimine antikehadega (brodalumab) (Oh *et al.*, 2000; Lowes *et al.*, 2005; Zaba *et al.*, 2009; Leonardi *et al.*, 2012; Langley *et al.*, 2014; Papp *et al.*, 2012).

Psoriaasi seisukohast on huvipakkuv ka tsütokiin IL-22, mis on samuti patsientide nahas ja vereplasmas üle-ekspressseerunud (Wolk *et al.*, 2006). IL-22 toodavad löövetes olevad T-rakud ja kaasasündinud immuunsüsteemi lümfoidsed rakud (Sabat *et al.*, 2013; Ward ja Umetsu, 2014). IL-22 indutseerib põletikku soodustavate geenide ekspressiooni, põhjustab epidermise suurenenud proliferatsiooni ning inhibeerib epidermise diferentseerumist üksi või koostoilmel IL-1 ja IL-17-ga, (Sa *et al.*, 2007; Boniface *et al.*, 2005).

1.5.2. Psoriaasi geneetiline taust

Psoriaasi tekkimisel mängivad rolli mitmed geneetilised faktorid. Uuringud on näidanud, et haiguse esinemise sagedus on kõrgem sugulaste hulgas: monosügootsetel kaksikutel on koosesinemise sagedus 65-72% ja disügootsete kaksikutel 15-30%. See näitab geneetilise tausta

olulisust haiguse tekkes (Gervin *et al.*, 2012; Lonnberg *et al.*, 2013; Pedersen *et al.*, 2008; Wuepper *et al.*, 1990). Geneetiliste faktorite leidmiseks on tehtud mitmeid ülegenoomseid assotsiatsiooni uuringuid (GWAS – *Genome-wide association study*), mille kaudu on tuvastatud üle 36 haiguse riskiga seostuva lookuse (Tang *et al.*, 2014; Tsoi *et al.*, 2012).

Kõige tugevamat seost psoriaasi ja geneetiliste markerite vahel nähakse genoomi (kromosoom, õlg jne asukoht) 300 kb pikkuses regioonis PSORS1, mis on nimetatud psoriaasi vastuvõtlikkuse regioon üheks (PSORS1- *Psoriasis susceptibility region 1*). Erinevate andmete põhjal vastutab see regioon 35-50 protsendi psoriaasi pärilikkuse eest (Fan *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2006; Sagoo *et al.*, 2004; Trembath *et al.*, 1997). Sellest piirkonnas on tuvastatud 11 geeni, mille funktsiooni häirumine võib viia psoriaasi tekkeni. Üheks teadaolevalt kõige tugevamini psoriaasiga seotud geeniks on *HLA* (*Human leukocyte antigen*) alleel *HLA-Cw6* (Nair *et al.*, 2000). *HLA-Cw6* täpne roll psoriaasis on teadmata, aga on pakutud, et *HLA-Cw6* toimib nii läbi kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi. Omandatud immuunsüsteemis osaleb see arvatavasti antigeenide esitlemises T-rakkudele. Kaasasündinud immuunsüsteemis osaleb *HLA-C* interaktsioonides KIR retseptoritega (*Killer immunoglobulin like receptors*), mis on ekspresseerunud loomulikes tapjarakkudes (NK rakud – *Natural killer*) ja NK T-rakkudes. *HLA-C* interaktsioonid saavad NK rakke sõltuvalt KIR retseptori tüübist nii aktiveerida kui ka inhibeerida. NK ja NK T-rakud on kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemi üheks ühenduslüliks ja neil võib olla oluline roll psoriaasi tekkimises (Gupta *et al.*, 2014).

PSORS1 regioonist on leitud veel kaks geeni, *CCHCR1* (*Coiled coil α -helical rod protein 1*) ja *CDSN* (*Corneodesmosin*), mis reguleerivad keratinotsüütide proliferatsiooni ja tõenäoliselt samuti osalevad haiguse tekkes. Psoriaasiga on leitud seos ka *LCE* (*Late cornified envelop*) geeni klastris, mis asub genoomis asukohas 1q21 (Capon *et al.*, 2004). *LCE* valgud mängivad rolli epidermise terminaalses diferentseerumises (Backendorf ja Hohl, 1992; Mischke *et al.*, 1996). Kogu Euroopat hõlmavate GWAS uuringute abil on tuvastatud, et psoriaasiga on seotud ka T-rakkude funktsiooni reguleerimise eest vastutavate geenid, nagu näiteks *RUNX3* (*Runt-related transcription factor 3*), *TAGAP* (*T-cell activation Rho GTPase-activating protein*) ja *STAT3* ning kaasasündinud immuunsüsteemi regulatsiooniga seotud geenid, sealhulgas *ZC3H12C* (*Zinc finger CCCH domain-containing protein 12C*), mis on oluline makrofaagide aktivatsioonis, ja *CARD14* ning

CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) NF-κB signaalirajalt (Tsoi *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2014).

1.5.3. miRNA-de roll psoriaasis

Psoriaatilises nahas on tervete inimeste nahast erinev miRNA-de ekspressioonimuster, mida suudeti esmakordselt näidata ülegenoomsete miRNA ekspressiooni analüüsides (Sonkoly *et al.*, 2007). Teise põlvkonna sekveneerimisega tuvastati psoriaasi haigete nahast 125 erinevat miRNA-d, mille ekspressioon on terve nahaga võrreldes üle kahe korra tõusnud või langenud, neist 90 miRNA-l on üleekspressioon ja 35 miRNA-l madalam ekspressioon (Joyce *et al.*, 2011). On näidatud, et erinevused miRNA-sid kodeerivates geenides võivad mõjutada miRNA ekspressiooni taset ja seondumise tugevust märklaudgeenidele ning seetõttu on mõjutatud ka miRNA poolt reguleeritavate valkude ekspressioon. Näiteks esineb miR-146a geenis (*MIR146A*) miR-146a-3p-d kodeerivas alas üksiku nukleotiidi polümorfism (SNP – *Single nucleotide polymorphisms*) rs2910164 C/G. On näidatud, et CG ja GG alleeli puhul selles positsioonis on kõrgeenenud psoriaasi risk, madalam miR-146a tase ja suurenenud keratinotsüütide proliferatsiooni soodustava valgu EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) ekspressioon (Zhang *et al.*, 2014). Lisaks võib toimuda miRNA-de ekspressiooni suurenemine või vähenemine tänu epigeneetilistele faktoritele, mis muudavad miRNA-de ekspressiooni haigusekoldes (Pivarcsi *et al.*, 2014).

Psoriaasi patsientide lööbelises nahas on märkimisväärselt suurenenud miRNA-de miR-21 ja miR-31 ekspressioon, vastavalt 4 ja 43 korda (Joyce *et al.*, 2011). Mõlema puhul on tegemist potentsiaalsete angiogeneesi soodustavate miRNA-dega (Wang ja Olson, 2009). On näidatud, et miR-21 endogeenne üleekspressioon surub nahas alla aktiveeritud T-rakkude apoptoosi, mis omakorda on põhjuseks tsütotoksiliste T-rakkude ja Th-rakkude suurenenud hulga psoriaasi patsientide dermises ja epidermises (Meisgen *et al.*, 2012). miR-31 üleekspressioon suurendab põletikuliste tsütokiinide tootmist ja soodustab leukotsüütide liikumist nahka. Tsütokiinide ja kemokiinide ekspressiooni regulatsioon miR-31 poolt toimub läbi seriin/treoniin kinaas 40 (STK40- *serine/threonine kinase 40*) inhibitsiooni, mis on NF-κB signalseerimise negatiivne regulaator keratinotsüütides (Xu *et al.*, 2012).

Kõrgemat ekspressiooni psoriaasi löövetes võrreldes terve nahaga on täheldatud veel miR-146a/b ja miR-203 puhul (Sonkoly *et al.*, 2007; Joyce *et al.*, 2011). miR-203 inhibeerib terves nahas transkriptsioonifaktorit p63 ja seeläbi ka rakkude proliferatsiooni (Lena *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2008). Psoriaasihaigete nahas ei ole endogeense miR-203 mõju siiski piisavalt tugev, et ära hoida psoriaasi ühte sümptomitest, keratinotsüütide hüperproliferatsiooni (Sonkoly *et al.*, 2007; Zibert *et al.*, 2008). Kuna miR-203 on võimeline inhibeerima SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*) ekspressiooni, moduleerib ta ka JAK-STAT signaalirajast sõltuvate tsütokiinide tootmist (Sonkoly *et al.*, 2007). miR-146a/b rolli psoriaasis ei ole täpsemalt uuritud. Enim allareguleeritud miRNA-d psoriaasi löövetes on miR-124 ja miR-4490, mis on vastavalt 5,8 ja 8 korda madalama ekspressiooniga (Joyce *et al.*, 2011). miR-124 funktsiooni on uuritud MCF-7 ja MDA-MB-435S rinnavähi rakuliinides, kus selle üleekspressioon surus alla tsükliin-sõltuva kinaasi CDK4 avaldumist, rakutsükli edenemist ja proliferatsiooni. Seega võiks soodustada miR-124 madalam ekspressioon psoriaasi löövetes sellele haigusele omast naha hüperproliferatsiooni (Feng *et al.*, 2015). miR-4490 kohta ei ole teadaolevalt tehtud funktsionaalseid uuringuid.

2. EKSPERIMENTAALOSA

Psoriaas on immuunsüsteemi häiretega seotud krooniline põletikuline nahahaigus, mille üheks iseloomulikuks tunnuseks on muutunud keratinotsüütide proliferatsiooni kiirus ja diferentseerumine (Smith, 2006; Lowes *et al.*, 2007). Psoriaatikute nahas on tervete inimeste nahast erinev miRNA-de ekspressioonimuster. miR-146a/b valiti uurimiseks, kuna varasemad geenikiibi andmed olid näidatud, et nad on kõrgemalt ekspresseerunud psoriaasi patsientide nahas ning kuna oli teada, et nad suruvad alla põletikulisi protsesse paljudes erinevates rakutüüpides (Sonkoly *et al.*, 2007). miRNA-del on tavaliselt palju erinevaid sihtmärke ning mitu erinevat funktsiooni. Seeetõttu huvitas meid kas miR-146a/b on ka muid funktsioone epidermises lisaks NF- κ B signaalraja aktivatsiooni allasurumise. Kindlin-1 valisime uurimiseks, kuna meie laboris teostatud geeniekspressiooni kiibi andmetel oli tema ekspressioon inhibeeritud miR-146a poolt (Rebane *et al.*, 2014). Kuna Kindlin-1 on keratinotsüütide proliferatsiooni positiivne regulaator, oletasime, et ta võib omada olulist rolli keratinotsüütide hüperproliferatsioonis psoriaasi löövetes (Herz *et al.*, 2006; Lai-Cheong *et al.*, 2009).

2.1. Töö eesmärgid

Lähtudes eelnevatest tulemustest meie laboris ja kirjanduses leitud, püstitati järgmised konkreetSED eesmärgid:

1. Analüüsida miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressiooni terves ja psoriaasi patsientide nahas ja primaarsetes inimese keratinotsüütides.
2. Hinnata miR-146a/b mõju keratinotsüütide proliferatsioonile.
3. Uurida, kas Kindlin-1 on miR-146a/b sihtmärk.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Töös uuritud indiviidid

Käesolevas magistritöös tehtud katsed, kus kasutati patsientidelt ja tervetelt vabatahtlikelt pärinevaid materjale on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt. Kõiki doonoreid informeeriti eelnevalt katse eesmärkidest ja nad kinnitasid uuringus osalemist allkirjastades kirjaliku nõusolekuvormi.

Käesolevas töös uuriti psoriaasi patsientide lööbelist ja tervet nahka ning tervete kontrollide nahka. Uuringus osales 12 patsienti naastulise psoriaasi vormiga ja 12 kontrollisikut, täpsemad andmed tabelis 1. Kõik osalised olid Eesti päritolu europiidse rassi esindajad. Psoriaasi patsientide naha proovid koguti Tartu Ülikooli Nahahaiguste kliinikus. Kontrollisikud on terved meditsiinitöötajad, tudengid või isikud, kes pöördusid Nahahaiguste kliinikusse sünnimärgi eemaldamiseks. Ühelgi kontrollisikul ei olnud kroonilisi nahahaigusi ega ei esinenud perekonnas psoriaasi. Igalt psoriaasi patsiendilt võeti kaks naha biopsiat (3-4 mm diameetriga), üks lööbelisest nahast ja teine tervest nahast, mis ei olnud pidevalt päikesega kokku puutunud. Igalt kontrollisikult võeti üks naha biopsia (3-4 mm diameetriga) piirkonnast, mis ei olnud pidevalt päikesega kokku puutunud. Kõik nahaproovid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ja hoiti -80° C juures kuni RNA eraldamiseni või koelõikude valmistamiseni.

Tabel 1. Katses uuritud indiviidid

	Katses osalejate arv	Sugu naine/mees	Vanus
Terved kontrollid	12	5/7	25-48
Psoriaas patsiendid	12	6/6	27-63

2.2.2. Inimese primaarse keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine

Käesolevas magistritöös kasutati primaarseid normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte täiskasvanud doonoritelt (NHEK- *Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes*) (PromoCell, Saksamaa). Rakkude kasvatamiseks kasutati *Keratinocyte-SFM* söödet (Invitrogen, USA) koos penitsilliini ja streptomütsiiniga 1:1000 (Lonza, Šveits). Kasvatamiseks ja paljundamiseks kasvatati rakke 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel inkubaatoris, milles oli 5% CO₂ keskkond, temperatuur oli 37° C ja inkubaator oli küllastunud veeauruga. Rakke passeeriti Trüpsiini-EDTA lahusega ((trüpsiin-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*): 0,05% trüpsiini ja 0,02% EDTA-d) (GE Healthcare, UK), trüpsiin inaktiveeriti Trüpsiini neutraliseeriva lahusega (Invitrogen, USA). Passaažinumbrid katsetes olid vahemikus kuus kuni üheksa.

2.2.3. Inimese primaarsete keratinotsüütide stimuleerimine tsütokiinidega

24 tundi enne stimulatsiooni külvati keratinotsüüdid tihedusel 40 000-50 000 rakku ühe kannu kohta (60-80% konfluentsusest) 12 kannuga plaatidele. Keratinotsüütide loendamiseks kasutati TC20™ automatiseeritud rakkude loendurit (Bio-RAD, USA). Rakke stimuleeriti 48 tundi tsütokiinidega: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-22 ja IL-23. Stimuleerimiseks kasutatud tsütokiinide lõppkontsentratsioonid lahuses on välja toodud tabelis 2. Rakkudelt eemaldati sööde koos tsütokiinidega ning pesti PBS-iga, lisati 500 μ l QIAzol Lysis reagenti (Qiagen, Saksamaa) ning hoiti -20° C juures kuni toimus edasine RNA eraldamine.

Tabel 2. Inimese primaarsete keratinotsüütide stimuleerimiseks kasutatud tsütokiinid

Tsütokiinid	Lõppkontsentratsioon lahuses	Tootja	Riik
IFN- γ	20 ng/ml	eBiosciences	USA
TNF α	20 ng/ml	Biolegend	USA
IL-1 β	10 ng/ml	Peptotech	UK
IL-17A	10 ng/ml	Peptotech	UK
IL-22	20 ng/ml	Biolegend	USA
IL-23	20 ng/ml	eBioscience	USA

2.2.4. Inimese primaarsete keratinotsüütide transfekteeimine

24 tundi enne transfektsiooni külvati 20 000-30 000 rakku ühe kannu kohta (30-50% konfluentsusest) 12 kannuga plaatidele. Rakkude loendamiseks kasutati TC20™ automatiseeritud rakkude loendurit (Bio-RAD, USA). Rakkude transfekteeimiseks kasutati siPORT™ NeoFX™ transfektsiooni reagenti (Life Technologies, USA) Opti-MEM® keskkonnas (Life Technologies, USA). Rakkude transfekteeimine toimus vastavalt tootja protokollile, kasutades miRNA-de miimide, prekursorite või inhibiitorite lõppkontsentratsiooni 60 nM ja ühe kannu kohta 3 μ l siPORT™ NeoFX™ transfektsiooni reagenti. Katsetes kasutatud miRNA-de prekursorid ja inhibiitorid on välja toodud tabelis 3. Pärast transfekteeimist asetati plaadid 37° C inkubaatorisse. Nende transfektsioonide korral, kus toimus ka keratinotsüütide stimuleerimine, lisati 24 tunni möödudes tsütokiinid IFN- γ ja TNF- α , mille lõppkontsentratsioonid lahuses on välja toodud

tabelis 2. Rakkudelt eemaldati sööde 48 tunni möödudes stimuleerimise algusest, pesti üks kord PBS-iga ja lisati 500 µl QIAzol Lysis reagenti ning hoiti -20° C juures kuni toimus edasine RNA eraldamine. Läbivoolutsütomeetria jaoks eemaldati 48 tunni möödudes transfekteeerimise algusest sööde ja toimus edasine analüüs.

Tabel 3. Transfekteeerimiseks kasutatud miRNA-d, LNA ja vastavad kontrollid

miRNA/LNA	Kataloogi number	Tootja	Riik
Prekursor-146a	AM17100	Life Technologies	USA
Mimic-146b	4464066	Life Technologies	USA
Negatiivne kontroll (prekursor)	AM17110	Life Technologies	USA
Negatiivne kontroll (mimic)	4464058	Life Technologies	USA
LNA-kontroll	199006	Exiqon	Taani
LNA-146a	450021	Exiqon	Taani

2.2.5. RNA eraldamine

2.2.5.1. Inimese primaarsetest keratinotsüütidest RNA eraldamine

Inimese primaarsetest keratinotsüütidest RNA eraldamiseks kasutati Direct-zol™ RNA MiniPrep komplekti (Zymo research, USA). Rakkudelt aspireeriti sööde, neid pesiti üks kord PBS-iga, lüüsi 500 µl QIAzol Lysis reagentiga (Qiagen, Saksamaa) ning lüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse. Edasi lisati 110 µl kloroformi (AppliChem, Saksamaa), tuube raputati 20 sekundit, inkubeeriti 2-3 minutit ning tsentrifuugiti 15 minutit 12 000 rcf 4 °C juures (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). Järgmisena eraldati vesifaas, millele lisati 1,5 mahtu 100%-list etanooli (Naxo, Eesti), segati ning kanti kolonnidele. Järgnev RNA eraldamine tehti vastavalt tootja protokollile (Direct-zol™ RNA MiniPrep komplekt). RNA elueeriti kolonnilt 50 µl milliQ vees. RNA kontsentratsioon ja puhtus mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetril (Thermo Scientific, USA).

2.2.5.2. Naha proovidest RNA eraldamine

Naha biopsiatele lisati 700 µl QIAzol Lysis reagenti, seejärel kude homogeniseerimisiti kasutades masinat gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Saksamaa). RNA eraldati miRNeasy Mini komplektiga (Qiagen, Saksamaa) vastavalt tootja protokollile. RNA kontsentratsioon ja puhtus mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetril. Psoriaasi patsientide ja tervete kontrollide naha biopsiatest RNA eraldamise tegid Ele Prans ja Liisi Šahmatova.

2.2.6. RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks

Esimese etapina viidi läbi RNA-le vastava DNA (komplementaarse DNA – cDNA) süntees pöördtranskriptaasi reaktsiooniga. Reaktsiooniks kasutati RNA-d keskmiselt kontsentratsiooniga 50 ng/µl. Kõigepealt segati kokku inkubeerides proove jääl RNA, Oligo(dT)₁₈ praimer (TAG Copenhagen, Taani) ja nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA). Segu kuumutati 5 minutit 65 °C juures, et eemaldada RNA sekundaarstruktuurid, misjärel asetati proovid uuesti jääle, kus lisati segusse RT puhver, RevertAid Reverse Transcriptase ja RNAasi inhibiitor (Thermo Scientific, USA). Täpsed kogused on välja toodud tabelis 4. cDNA süntees viidi läbi 96 kannuga plaadil 1 tund 42 °C juures ning reaktsioon peatati kuumutamisel 10 minutit 70 °C juures kasutades termotsüklerit Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa). cDNA lahjendati lõppmahuni 500 µl ning kasutati kohe peale sünteesi või säilitati -20 °C juures.

Tabel 4. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus 1 proovi kohta
RNA proov	11,5 µl
100 µM Oligo dT	1 µl
10x dNTP segu	2 µl
5x RT puhver	4 µl
Ensüüm	1 µl
RNAasi inhibiitor	0,5 µl

Teise etapina tehti kvantitatiivne PCR reaktsioon, mille jaoks kasutati 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat. qPCR-i programm on välja toodud tabelis 5.

Reaktsioon viidi läbi 12 µl reaktsiooni segus, mis sisaldas 6 µl cDNA-d, 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu (Solis Biodyne, Eesti), 1 µl 4 µM F+R praimereid (Tabel 6) (TAG Copenhagen, Taani) ja 2,6 µl mQ vett. Proovid pipeteeriti 384 kannuga plaatidele, iga proov mõõdeti kolmes korduses. Saadud tulemused analüüsiti võrdleva Ct väärtuste meetodil (Life Technologies, USA). Erinevate geenide ekspressioon normaliseeriti kasutades referentsgeeniks EEF1A1 (*Elongation factor 1-alpha 1*).

Tabel 5. qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aega	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	95	15 minutit	1
Denatureerimine	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioonianalüüsi etapp	95	15 sekundit	1
	60	15 sekundit	
	95	15 sekundit	

Tabel 6. Kasutatud praimerid

Praimer	Produkti pikkus (nt)		Järjestus
FERMT1	92	F	5' TGATGCAGCCACCGGGATTCCA 3'
		R	5' CGATGACCACCTGCCGGGTTC 3'
EEF1A1	94	F	5' CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT 3'
		R	5' TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT 3'

2.2.7. RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks

Esimese etapina viidi läbi terminaalse lingu pöördtranskriptsioon (*Stem-loop RT*), et igale miRNA-le sünteesida individuaalne cDNA. Selleks kasutati terminaalse lingu praimereid, mis seonduvad spetsiifiliselt igale miRNA-le 8 nukleotiidi abil nende 3'-poolses alas. Kasutati 5x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US) praimereid miRNA-dele miR-146a, miR-146b ja let-7a. Reaktsioonisegu koostis on välja toodud tabelis 7. Reaktsioon toimus 6 µl

reaktsioonisegus 96-kannuga plaadil kasutades Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) masinat ja programmi: 30 minutit 16 °C, 30 minutit 42 °C, 10 minutit 85 °C ja 20 °C ∞. Valmis cDNA kasutati kohe peale sünteesi või säilitati -20 °C juures.

Tabel 7. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus 1 proovi kohta
100 nM dNTP	0,028 µl
100 µM RT ensüüm	0,2 µl
10x RT puhver	0,6 µl
RNAasi inhibiitor	0,1 µl
H ₂ O	2,07 µl
5x RT praimer	1 µl
RNA proov	2 µl

Edasi viidi läbi kvantitatiivse PCRi reaktsioon, mille programm on välja toodud tabelis 8. Igale 96-kannulisel plaadil olevale proovile lisati 17 µl reaktsioonisegu, kus oli 4,4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Eesti), 11,6 µl milliQ vett ja 1 µl 20x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US) proove, miR-146a, miR-146b või let-7a. Lahus pipeteerit 10 µl kaupa 384-kannulisele plaadile ehk iga proov mõõdeti kahes korduses. miRNA-de suhtelise ekspressiooni tuvastamiseks kasutati 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat. Saadud tulemused analüüsiti võrdleva Ct väärtuste meetodil (Life Technologies, USA), referentsina kasutati let-7a.

Tabel 8. qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	95	10 minutit	1
Denatureerimine	95	15 sekundit	40
Pikendamine	60	60 sekundit	

2.2.8. Eluvõime katse

Keratinotsüüdid transfekeeriti 96-kannulisel plaadil, kuhu 24 tundi enne transfektsiooni külvati 3000 rakku ühe kannu kohta. Rakkude eluvõime uurimiseks kasutati CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability kitti (Promega, USA), mis määrab eluvõimeliste rakkude hulka kvantifitseerides rakkudes olevat ATP-d. Mõõtmine teostati 48 tundi pärast transfektsiooni algust. Selleks asendati KC-SFM sööde 100 µl seerumivaba DMEM söötmega (Life Technologies, USA), millele lisati 100 µl CellTiter-Glo® reagenti ning plaate raputati 2 minutit rakkude lüüsimiseks. Edasi hoiti plaate 10 minutit toatemperatuuril, et luminesentsi signaal saaks stabiliseeruda. Luminesentsi signaali mõõtmiseks kasutati Tecan Infinite M200 Pro™ mikroplaadilugejat (Tecan Group Ltd., Šveits) ja programmi Tecan i-control™ versiooni 1.7 (Tecan Group Ltd).

2.2.9. Inimese primaarsete keratinotsüütide proliferatsiooni kiiruse hindamine loendamise abil

Igale 12-kannulisele plaadile külvati 20 000-30 000 rakku ühe kannu kohta. Rakud transfekeeriti, eemaldati plaadilt 48 tunni möödudes trüpsiiniga ja koguti 2 ml tuubidesse, kuhu lisati trüpsiini neutraliseeriv lahus ning tsentrifuugiti 250 rcf juures 6 minutit 4 °C. Rakkudelt eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 1 ml külmas PBS-is (fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*Phosphate Buffered Saline*)). Rakkude loendamiseks kasutati 10 µl rakkude suspensiooni, mis segati 10 µl 0,4% trüpaansinise lahusega (Life Technologies, USA). Rakke loendati kasutades TC20™ automatiseeritud rakkude loendurit (Bio-RAD, USA).

2.2.10. Rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetrial

Läbivoolutsütomeetriat kasutati, et analüüsida keratinotsüütide jaotuvust erinevate rakutsükli faaside vahel. Rakkude plaadilt eemaldamine toimus eelmises 2.2.9. peatükis kirjeldatud meetodil. Külmas PBS-is olevad rakud taaskord tsentrifuugiti 250 rcf 6 minutit 4 °C juures, pesu etapp korraldati iga sammu vahel. Edasi eemaldati supernatant ning rakud fikseeriti 70% etanoolis jääl 30 minutit. Seejärel rakud tsentrifuugiti 15 minutit 500 rcf 4° C juures. Edasi toimus rakkude permabiliseerimine 0,1% Triton-X100-PBS-is 10 minutit toatemperatuuril. Rakud värviti DAPI-ga (Roche, Šveits) 1 µg/ml, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Proove analüüsiti

läbivoolutsütomeetiga BD LSRFortessa (BD Biosciences, USA), iga proovi kohta salvestati 10 000 sündmust. Lõplik rakutsükli analüüs tehti tarkvaraga ModFit LT (Verity Software House, USA).

2.2.11. SDS-PAGE ja Western blotting

Inimese primaarsed keratinotsüüdid lüüsiiti Laemmli puhvris, mis sisaldas 2% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), 10% glütserooli, 100 mM DTT (*Dithiothreitol*), 0.01% bromofenool sinist ja 50 mM Tris-Cl (pH 6,8). Lüsate kuumutati 5 minutit 95°C juures valkude denatureerimiseks. 10 µl igat valgu lüsaati kanti 10% SDS-poliakrüülamiid-geelelektroforeesi (SDS-PAGE) geelile. Valgud lahutati geelektroforeesil 20 minutit 90 V juures ja 40 minutit 130 V juures Mini-PROTEAN® Tetra Cell masinaga (Bio-Rad, USA). Foreesi lõppedes asetati geel ja eelnevalt metanooli kastetud Immobilon™-P PVDF membraan (Millipore) 5 minutiks ülekandepuhvrissse (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 10% metanool, 0,1% SDS). Valgud kanti geelilt üle membraanile kasutades Trans-Blot® Turbo™ Transfer süsteemi (Bio-Rad, USA) 25 V juures 30 minutit. Membraan blokeeriti mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks 5% lõssipulbri lahuses TBST-s (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) üks tund toatemperatuuril loksutil. Edasi inkubeeriti membraani primaarse antikehaga, mis oli lahustatud 5% lõssipulbri TBST lahuses, üleöö 4°C juures loksutil. Membraan pesti 5 x 7 minutit TBST-s toatemperatuuril loksutil. Edasi inkubeeriti membraani sekundaarse antikehaga, mis oli lahustatud TBST lahuses, kuhu oli lisatud 5% lõssipulbrit toatemperatuuril 1 h loksutil ning korrati pesu. Kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad on näidatud tabelis 9. Signaali visualiseerimiseks kasutati Amersham ECL Select Western blotting komplekti (GE Healthcare, UK). Membraani inkubeeriti reaktsioonisegus 5 minutit toatemperatuuril vastavalt tootja protokollile. Tulemused visualiseeriti ImageQuant™ RT ECL™ kaameraga (GE Healthcare, UK) ning edasiseks analüüsimiseks kasutati ImageJ programmi (National Institutes of Health, USA)

Tabel 9. Primaarsed ja sekundaarsed antikehad (Western blot)

Primaarsed antikehad	Tüüp	Lahjendus (Western blot)	Tootja	Riik
Kindlin-1	Küüliku polükloonaalne antikeha	1:250	Atlas Antibodies	Rootsi
GAPDH	Hiire monokloonaalne antikeha	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA
Sekundaarsed antikehad				
Küülikuvastane hobuse antikeha	Mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha	1:2000	Cell singaling	USA
Hiirevastane kitse antikeha	Mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha	1:2000	Cell singaling	USA

2.2.12. Immunofluorestsentsanalüüs

Psoriaasi patsientide lööbelisest nahast ja tervetest kontrollide nahast lõigati 10 µm paksused lõigud, mis asetati mikroskoobi klaasidele ja fikseeriti 4% paraformaldehüüd lahusega 10 minutit toatemperatuuril. Kõik ülejäänud etapid toimusid samuti toatemperatuuril ja nende vahel pesti lõike kolm korda PBS-iga kui ei ole kirjeldatud teistmoodi. Lõigud permeabiliseeriti 0,1% Triton-X-100 PBS lahuses 10 minutit ning ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks inkubeeriti 10% eesli seerumi ja 0,5% veise seerumi albumiin lahuses PBS-is (blokeerimislahus) 100 µl tilkades üks tund. Rakke pesti üks kord PBS-iga, misjärel inkubeeriti neid 50 µl blokeerimislahuse tilkades, kuhu oli lisatud primaarne antikeha 1 tund toatemperatuuril. Kasutatud primaarsed ja sekundaarne antikeha on välja toodud tabelis 10. Edasi inkubeeriti 50 µl blokeerimislahuse tilkades sekundaarse antikehaga 30 minutit niisutuskambris. Järgnevalt lisati rakkudele DAPI lahus (DAPI 1 µg/ml PBS-is (Roche, Šveits)). Klaasid sulundati sulundusseguga (StayBrite Hardset Mounting Medium, (Biotium USA)). Preparaatide analüüsimiseks kasutati Leica DM5500 B mikroskoopi (Leica Microsystems, Saksamaa).

Tabel 10. Primaarsed ja sekundaarsed antikehad (Immunofluorestsents)

Primaarsed antikehad	Tüüp	Lahjendus (Immunofluorestsents)	Tootja	Riik
Kindlin-1	Küüliku polükloonaalne antikeha	1:80	Atlas Antibodies	Rootsi
KRT10	Küüliku polükloonaalne antikeha	1:100	Atlas Antibodies	Rootsi
Sekundaarne antikeha				
Alexa-488	Küülikuvastane kitse polükloonaalne antikeha	1:1000	Life Technologies	USA

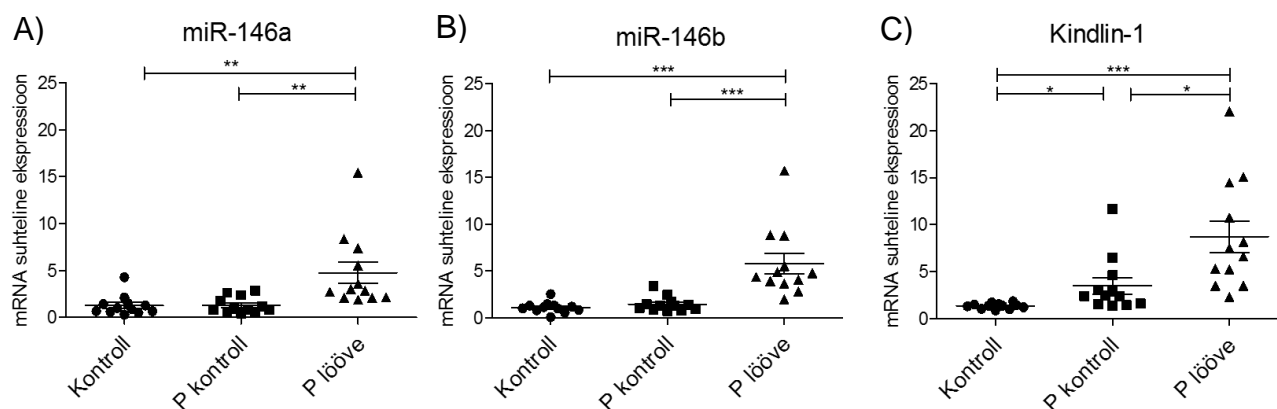
2.2.13. Statistiline analüüs

Andmete analüüsimiseks ja tulemuste esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA). Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati sõltumatute valimite keskväärtuste võrdlemiseks mõeldud T-testi (*Unpaired T-test*). Graafikutel on esitatud ühe tüübilise katse tulemuste keskmised koos standardveaga (SEM – *Standard Error of the Mean*). N joonise allkirjas näitab korduste arvu ühes katses. Tulemused loeti statistiliselt olulisteks $P < 0,05$ juures. Joonistel kasutakse järgnevat tähistust: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

2.3. TULEMUSED

2.3.1. miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioon psoriaasi patsientide nahas

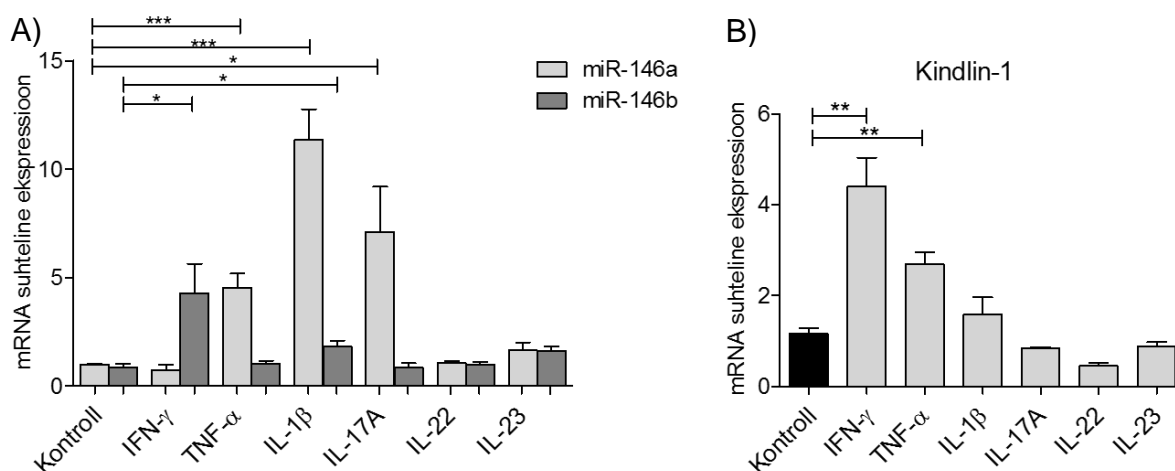
Varasemad geeniekspressiooni kiibi andmed olid näidanud, et psoriaasi patsientide nahas on miR-146a/b kõrgemalt ekspresseerunud kui tervete kontrollisikute naha proovides (Sonkoly *et al.*, 2007). Meie laboris teostatud katse kinnitas nimetatud tulemust ja näitas, et miR-146a/b ekspressioon on kõrgem psoriaasi patsientide lööbelises nahas võrreldes psoriaasi patsientide mittelööbelise nahaga ning tervete kontrollisikute nahaga. miR-146a/b olid vastavalt 4,8 ($\pm 1,2$) ja 5,8 ($\pm 1,1$) korda kõrgema ekspressiooniga psoriaasi patsientide lööbelises nahas võrreldes kontrollproovidega (Joonis 6A ja 6B). Järgmisena analüüsisime miR-146a oletatava märklaua Kindlin-1 ekspressiooni psoriaasi haigete ja tervete kontrollisikute nahas. Joonis 6C näitab, et Kindlin-1 ekspressioon oli kõrgeks psoriaasi patsientide lööbelises nahas ja psoriaasi patsientide kontrollnahas võrreldes tervete kontrollidega. Kindlin-1 ekspressioon oli keskmiselt 8,7 ($\pm 1,7$) korda kõrgem psoriaasi patsientide lööbelises nahas ja 3,5 ($\pm 0,9$) korda kõrgem psoriaasi patsientide kontrollnahas võrreldes kontrollproovidega.



Joonis 6. miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioon nahas. miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises nahas (P lööve), psoriaasi patsientide kontrollnahas (P kontroll) ja tervete kontrollisikute nahas (Kontroll). miRNA ja mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodiga. Tulemused on normaliseeritud koduhoidjate miRNA let-7a (A, B) või EEF1A1 mRNA (C) ekspressiooni tasemetega ja kontrollväärtuste keskmise suhtes (=1). Veapiirid näitavad standarddviaga (SEM). Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). N=12, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. (Ele Prans ja Liisi Šahmatova teostasid psoriaasi patsientide proovidest miR-146a/b RT-qPCR-id).

2.3.2. Psoriaasis oluliste tsütokiinide mõju miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotüütides

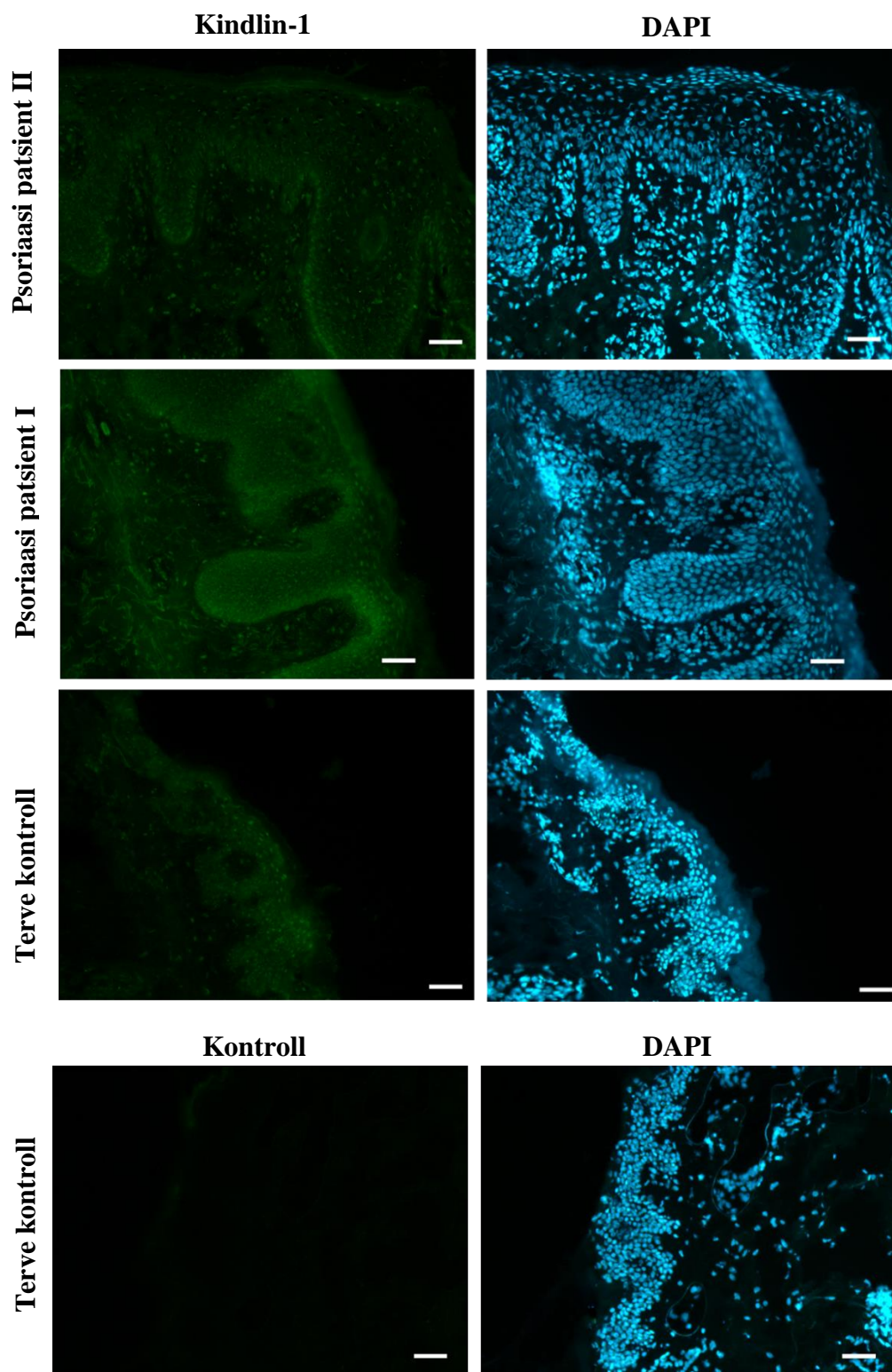
Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti kuue erineva tsütokiiniga IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-22 ja IL-23, et uurida millised neist võivad põhjustada miR-146a/b kõrgeenenud ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelises nahas. Eelnevalt oli teada, et need tsütokiinid on psoriaasi patsientide nahas ülesreguleeritud ja mängivad olulist rolli haiguse sümptomite tekkes ja püsimises (Baliwag *et al.*, 2015). Nähti, et miR-146a ja miR-146b ekspressioon on ülesreguleeritav erinevate tsütokiinidega. miR-146a ekspressioon suurenes TNF- α , IL-1 β ja IL-17A toimel, vastavalt 4,5 ($\pm 0,7$), 11,4 ($\pm 1,4$) ja 7,1 ($\pm 2,1$) korda. miR-146b ekspressioon suurenes stimuleerimisel IFN- γ ja IL-1 β -ga vastavalt 4,3 ($\pm 1,3$) ja 1,8 ($\pm 0,3$) korda (Joonis 7A). Kindlin-1 mRNA ekspressioon oli mõjutatav tsütokiinidega IFN- γ ja TNF- α , ekspressiooni tase tõusis vastavalt 4,4 ($\pm 0,6$) ja 2,7 ($\pm 0,3$) korda (Joonis 7B). Antud tulemuste põhjal võib oletada, et psoriaasi patsientide lööbelises nahas põhjustavad Kindlin-1 kõrgeenenud ekspressiooni IFN- γ ja TNF- α , miR-146a kõrgeenenud ekspressiooni eest vastutavad tsütokiinid TNF- α , IL-1 β ja IL-17A ning miR-146b taseme tõusu põhjustavad IFN- γ ja IL-1 β .



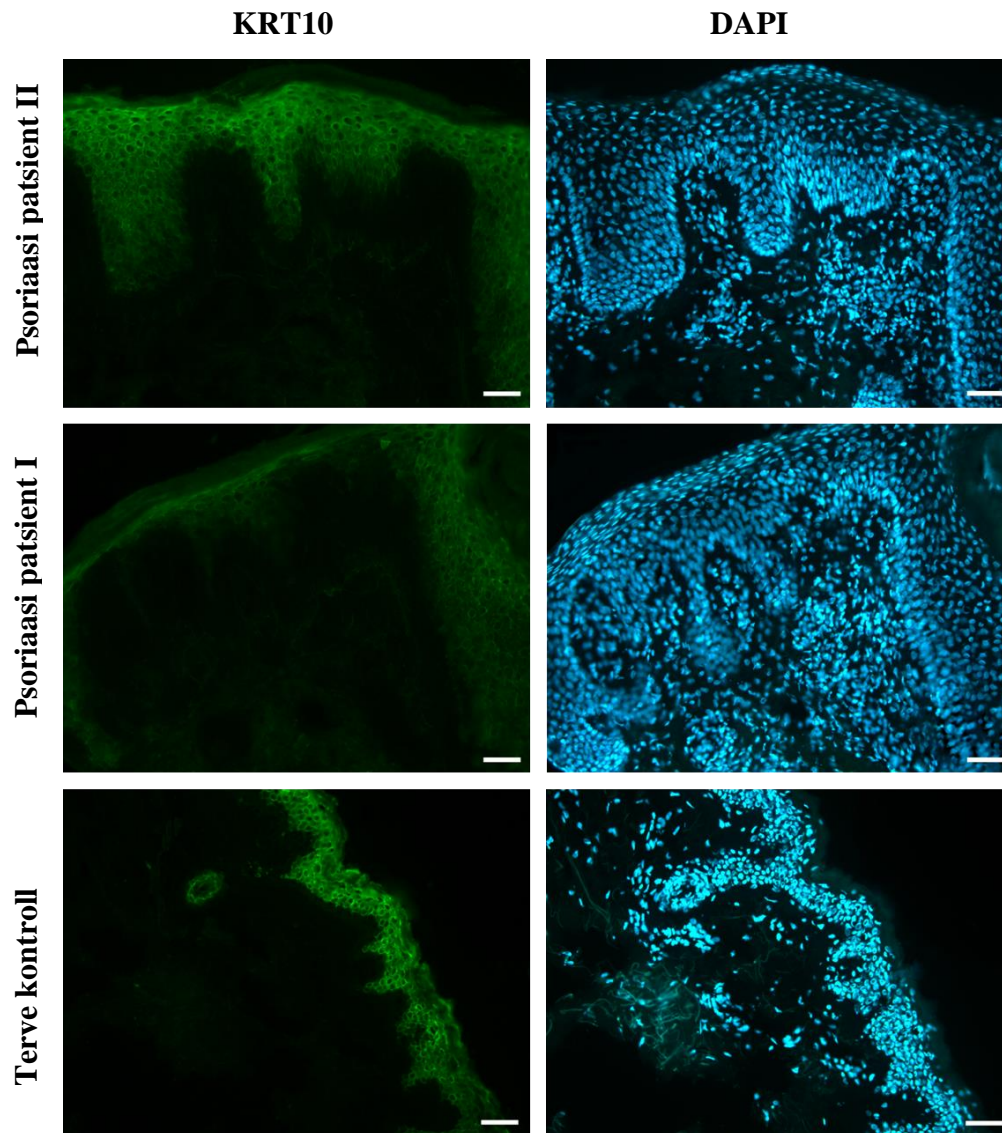
Joonis 7. miR-146a/b ja Kindlin-1 suhteline ekspressioon keratinotsüütides psoriaasis oluliste tsütokiinidega stimuleerimisel. miR-146a/b (A) ja Kindlin-1 (B) suhteline ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides. Mõõtmised on tehtud 48 tundi peale stimulatsiooni algust joonisel näidatud tsütokiinidega. miRNA ja mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodiga. Tulemused on normaliseeritud koduhoidjate miRNA let-7a või EEF1A1 mRNA ja mittestimuleeritud rakkude (Kontroll) ekspressiooni tasemete suhtes (=1). Graafikutel on esitatud kolme paralleelselt tehtud stimulatsiooni keskmised väärtused ja SEM. Tulemuste analüüsimiseks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). A) N=5, B) N=3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

2.3.3. Kindlin-1 ekspressioon ja paiknemine nahas.

Edasi analüüsiti millistes naha piirkondades on Kindlin-1 ekspresseerunud ning kas tema ekspressioon on suurenenud psoriaasihaigetel ka valgu tasemel. Selleks teostati immunofluorestsentsanalüüs tervete inimeste ja psoriaasi patsientide lööbelise naha koelõikudel. Psoriaasi patsientide lööbelises nahas on näha tugevamat Kindlin-1 ekspressiooni kui kontrollisikute terves nahas. Kõige intensiivsem on Kindlin-1 ekspressioon psoriaasi haigete naha basaalkihis, kus paiknevad kiiresti prolifereeruvad ja vähe diferentseerunud keratinotsüüdid (Joonis 8). Rakkude diferentseerumise hindamiseks tehti immunofluorestsentsanalüüs KRT10-le, mis on olemas diferentseerunud keratinotsüütides, aga puudub mittediferentseerunud rakkudest. Jooniselt 9 on näha, et KRT10 puudub tervete kontrollide ja psoriaasi patsientide lööbelise naha basaalkihist. Näha on ka seda, et psoriaasi patsientide lööbelises nahas on KRT10 ekspressioon madalam võrreldes tervete kontrollidega kogu epidermise ulatuses, mis viitab madalamale keratinotsüütide diferentseerumise astmele. Jooniselt 8 ja 9 on näha, et psoriaasi patsientide lööbeline epidermis on tõepoolest tunduvalt paksem võrreldes tervete kontrollisikute nahaga. Vale-positiivsete tulemuste välistamiseks värviti koelõiku ilma primaarse Kindlin-1 või KRT10 antikehata (Joonis 8, Kontroll).



Joonis 8. Kindlin-1 ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises ja terve kontrollisiku nahas. Immunofluorestsentsanalüüs psoriaasi patsientide lööbelisest (Psoriaasi patsient I ja II) ja terve kontrollisiku (Terve kontroll) nahast. Koelõigud on värvitud Kindlin-1 vastase antikeha ja DAPI-ga. Kontroll tähistab DAPI-ga ja ilma primaarse antikehata värvitud proovi. Skaala=50 µm.

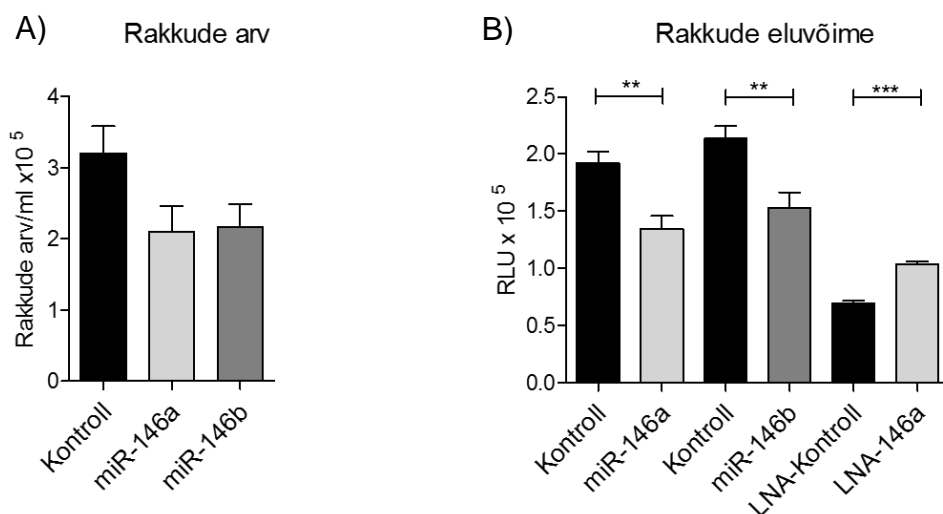


Joonis 9. KRT10 ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises nahas ja tervete kontrollisikute nahas. Immunofluorestsentsanalüüs psoriaasi patsientide lööbelisest (Psoriaasi patsient I ja II) ja terve kontrollisiku (Terve kontroll) nahast. Koelõigud on värvitud KRT10 vastase antikehaga ja DAPI-ga. Skaala=50 µm.

2.3.4. miR-146a/b mõju keratinotsüütide eluvõimele ja proliferatsioonile

Psoriaasi üheks iseloomulikuks tunnuseks on keratinotsüütide liigne proliferatsioon nahas, millest tulenevalt uuriti järgmisena, kas miR-146a/b mõjutavad keratinotsüütide proliferatsiooni. Selleks kasutati kahte erinevat meetodit. Esiteks uuriti rakkude otsest proliferatsioonivõimet: koekultuuri kannudele külvati võrdne arv rakke, mida transfekteeeriti miR-146a/b või kontroll-miRNA-ga ning seejärel loendati rakud 48 tunni möödudes. Kannudes, kus oli transfekteeeritud keratinotsüüte

miR-146a/b-ga, oli rakke 30% ($\pm 15\%$) vähem võrreldes kontrolliga, kuid suure katsevea tõttu, ei olnud see erinevus statistiliselt oluline (Joonis 10A). Järgmisena kasutati keratinotsüütide proliferatsioonivõime uurimiseks CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability kitti (Promega, USA), mis võimaldab määrata eluvõimeliste rakkude hulka kvantifitseerides ATP-d. Selle katse tulemus näitas, et kartinotsüüdid, mis olid transfecteeritud miR-146a/b-ga, olid 30% ($\pm 9\%$) väiksema eluvõimega võrreldes kartinotsüütidega, mida transfecteeriti kontroll-miRNA-ga (Joonis 10B). Endogeense miR-146a inhibeerimine omakorda tõstis keratinotsüütide eluvõimet 30% ($\pm 2\%$) (Joonis 10B).

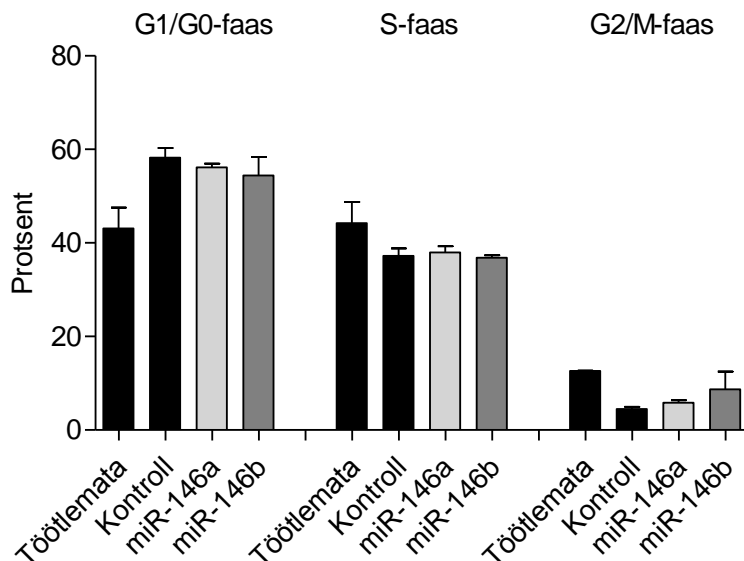


Joonis 10. miR-146a/b mõju keratinotsüütide proliferatsioonile. Keratinotsüüte transfecteeriti miR-146a prekursori (miR-146a), miR-146b miimi (miR-146b), kontroll-miRNA prekursori (Kontroll), miR-146a inhibiitori (LNA-146a) või kontroll-inhibiitoriga (LNA-Kontroll). A) Rakkude arv loeti 48 tunni möödudes transfectsiooni algusest. B) RLU – suhteline luminescentsi ühik (*Relative Luminescent Unit*) mõõdeti 48 tunni möödudes transfectsiooni algusest. Graafikutele on esitatud paralleelselt tehtud transfectsioonide keskmised väärtused ja standardviga. A) N=3, B) N=6, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

2.3.5. Rakutsükli analüüs

Järgmisena uuriti kas miR-146a/b-l on mõju keratinotsüütide jaotusele eri rakutsükli faaside vahel kasutades DAPI-ga värvitud rakkude läbivoolutsütomeetrilist analüüsi, mis võimaldab hinnata DAPI intensiivsuse järgi DNA kogust rakus. Keratinotsüüte transfecteeriti miR-146a/b-ga, kontroll-miRNA-ga või jäeti transfecteerimata. Tulemused mõõdeti 48 tundi peale transfectsiooni algust ning analüüsiti Tarkvaraga ModFit LT. Töötlemata keratinotsüütide puhul oli G1/G0-faasis

43%, S-faasis 44% ja G2/M-faasis 13% rakkudest. Transfekteeritud keratinotsüütides on nii kontrolli kui ka miR146a/b korral G1/G0-faasis ~55%, S-faasis ~40% ja G2/M-faasis ~5% rakkudest (Joonis 11). Märkimisväärselt erinevust keratinotsüütide transfekteerimisel kontroll-miRNA prekursoriga või miR-146a/b-ga näha ei olnud.



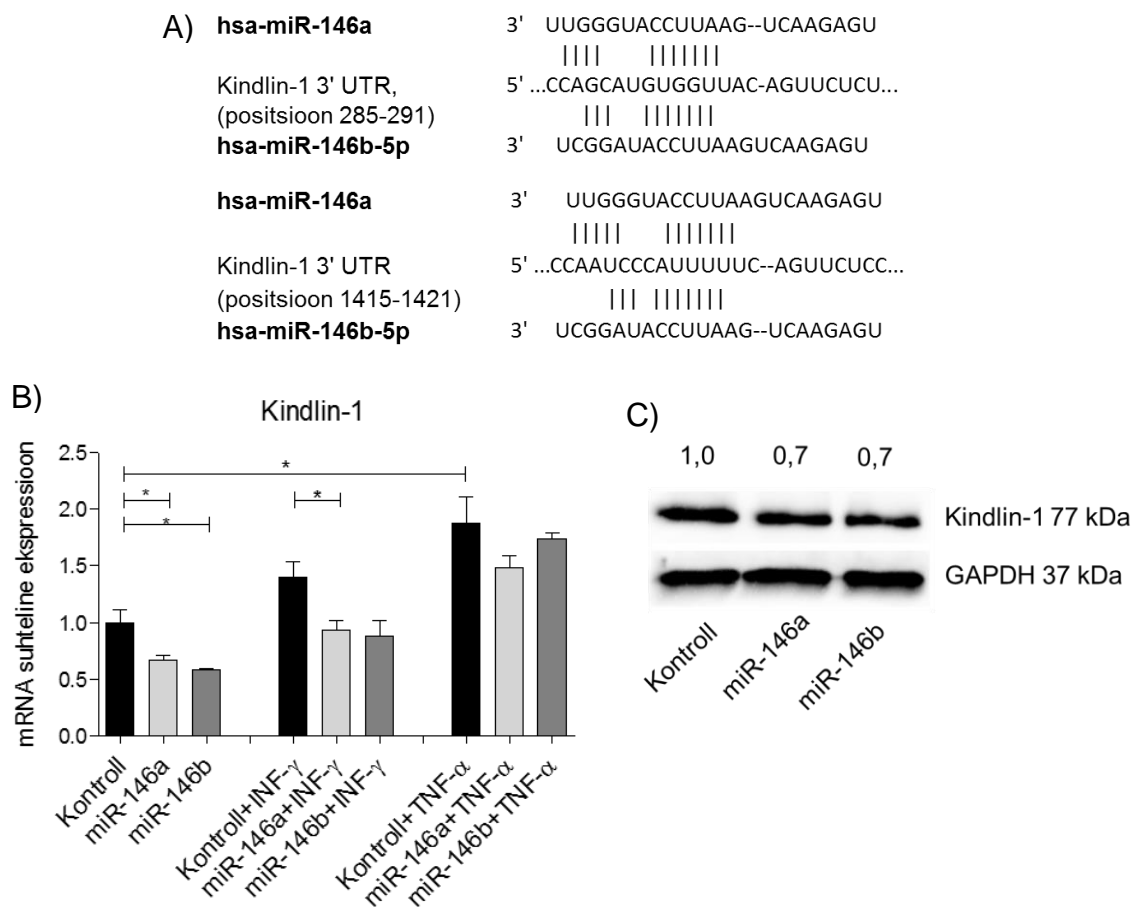
Joonis 11. miR-146a/b toime keratinotsüütide jaotusele rakutsükli eri faasidesse. Keratinotsüüte transfekteeriti miR-146a prekursoriga (miR-146a), miR-146b miimiga (miR-146b), kontroll-miRNA prekursoriga (Kontroll) või jäeti transfekteerimata (Töötlemata). DAPI hulk rakkudes analüüsiti läbivoolutsütomeetrial 48 tunni möödudes transfektsiooni algusest. Graafikutel on esitatud paralleelselt tehtud transfektsioonide keskmised väärtused rakutsükli faaside kaupa ja standardviga. N=3.

2.3.6. Kindlin-1 on miR-146a/b oletatav märklaudgeen

Targetscan 6.2⁴ ennustuse järgi on miR-146a/b-l kaks Kindlin-1 seundumissaiti, mis paiknevad positsioonides 285-291 ja 1415-1421 alustades lugemist mRNA 3'UTR esimesest nuklotiidist (Joonis 12A). miR-146a/b mõju Kindlin-1 ekspressioonile uurimiseks transfekteeriti keratinotsüüte miR-146a/b ja vastava kontrolliga ning 24 tunni möödudes stimuleeriti rakke Kindlin-1 ekspressiooni suurendavate tsütokiinidega IFN- γ ja TNF- α (Joonis 12B). mRNA tasemel vähendas miR-146a/b Kindlin-1 ekspressiooni 1,5 ($\pm 0,04$) ja 1,7 ($\pm 0,01$) korda võrreldes kontroll-transfektsiooniga stimuleerimata keratinotsüütides. IFN- γ mõjul suurenes Kindlin-1 ekspressioon 1,4 korda ($\pm 0,1$) ning miR-146a/b üleekspressioon vähendas seda vastavalt 1,5

⁴ http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_61/view_gene.cgi?rs=NM_017671&taxid=9606&members=miR-146ac/146b-5p&showcnc=1&shownc=1&showncf=0#miR-146ac/146b-5p

($\pm 0,09$) ja 1,6 ($\pm 0,1$) korda. Kui rakke stimuleeriti TNF- α -ga, siis Kindlin-1 tase suurenes 1,9 ($\pm 0,2$) korda, kuid miR-146a/b ei omanud olulist inhibeerivat toimet võrreldes kontroll-transfektsiooniga (Joonis 12B). Stimuleerimata keratinotsüütides detekteerisime Kindlin-1 valgu taseme vähenemise 1,4 korda miR-146a/b üleekspressiooni korral võrreldes kontroll transfektsiooniga (Joonis 12C). IFN- γ ja TNF- α -ga stimuleeritud rakkudes ei tuvastanud me erinevusi Kindlin-1 valgu tasemetes miR-146a/b- ja kontroll-transfekteeeritud rakkudes (tulemusi ei ole näidatud).



Joonis 12. miR-146a/b üleekspressiooni mõju Kindlin-1 ekspressioonile keratinotsüütides.

Keratinotsüüte transfekteeeriti miR-146a prekursoriga (miR-146a), miR-146b miimiga (miR-146b) ja kontroll-miRNA prekursoriga (Kontroll) ning stimuleeriti 24 tunni möödudes joonisel näidatud tsütokiinidega. A) Teoreetilised miR-146a/b seundumiskohad Kindlin-1 mRNA 3'UTR alas, positsioonid on näidatud alates 3'UTR esimesest nukleotiidist. B) mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil. Tulemused on normaliseeritud koduhoidja EEF1A1 mRNA ekspressiooni taseme ja mittestimuleeritud kontrolli suhtes (=1). Graafikutel on esitatud kolme paralleelse transfektsiooni keskmised väärtused ja standardviga. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. C) Western blot analüüs. Kindlin-1 densitomeetria tulemused on normaliseeritud vastavate GAPDH väärtuste ja kontrolli suhtes (=1). B, C) Transfektsioonid 72 ja stimulatsioonid 48 tundi.

2.4. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Psoriaas on levinud põletikuline nahahaigus, mille molekulaarsetes mehhanismides ei ole veel täielikult selgusele jõutud. Kasutades väikeste RNA sekveneerimist on psoriaasi haigete nahas näidatud 125 miRNA erinevat ekspressiooni võrreldes terve nahaga (Joyce *et al.*, 2011). Sellest tulenevalt võib arvata, et mitmed miRNA-d mõjutavad psoriaasi teket ja kulgu. miR-146a/b üheks teadaolevaks funktsiooniks on immuunsüsteemi negatiivne regulatsioon põletikuliste protsesside korral. Käesolevas töös uurisime kas miR-146a/b mõjutavad keratinotsüütide proliferatsiooni ning keratinotsüütide proliferatsiooni positiivse regulaatori, Kindlin-1, avaldumist.

Töös kinnitati miR-146a/b ning tuvastati Kindlin-1 kõrgeenenud ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises nahas. Kindlin-1 kõrgeenenud ekspressiooni analüüsi ka immunofluorestsents mikroskoopiaga, kus nähti psoriaasi patsientide lööbelise naha koelõikudel, et valgu ekspressioon oli kõige tugevam basaalkihi proliferatiivsetes ja mittediferentseerunud keratinotsüütides. Samuti leiti töös, et miR-146a/b mõjul väheneb inimese primaarsete keratinotsüütide proliferatsioon. Lisaks näitasime, et miR-146a/b mõlemad inhibeerivad Kindlin-1 ekspressiooni nii RNA kui ka valgu tasemel inimese primaarsetes keratinotsüütides.

Varem on näidatud, et psoriaasis kõrgeenenud ekspressiooniga miRNA-de hulgas on ka miR-146a/b (Sonkoly *et al.*, 2007). Lisaks on eelnevalt kirjeldatud miR-146a seost psoriaasi tekkega töös, kus leiti SNP rs2910164 ning CG ja GG genotüüpide olemasolul miR-146a geenis on nahas madalam miR-146a tase ning suurem risk haigestuda psoriaasi (Zhang *et al.*, 2014). Käesolevas töös kinnitati kõrgeenenud 146a/b ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelises nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga.

miR-146a/b inhibeeriv mõju Kindlin-1 ekspressioonile näidati esmakordselt geeniekspressiooni kiibiga Rebane jt poolt teostatud uurimuses (Rebane *et al.*, 2014). Kindlin-1 valk osaleb keratinotsüütide aktiveerimisel β -integrinide signaaliraja kaudu, mis on vajalik rakkude kiireks proliferatsiooniks (Larjava *et al.*, 2008). Kindlin-1 puudumisel on keratinotsüütides häirunud adhesioonivõime, suunatud migratsioon ja proliferatsioon (Herz *et al.*, 2006; Lai-Cheong *et al.*, 2009). Käesolevas töös tuvastati Kindlin-1, kõrgeenenud ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelises ja kontrollnahas. Üldiselt on teada, et Kindlin-1 on ekspresseerunud naha basaalkihi

keratinotsüütides ja soolestiku epiteelis (Herz *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2003). Immunofluorestsentsanalüüsist on näha, et Kindlin-1 on kõige tugevama ekspressiooniga psoriaasi patsientide lööbelise naha basaalkihi keratinotsüütides.

Edasi uuriti, mis võib põhjustada miR-146a/b ja Kindlin-1 kõrgeks tõusnud ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelises nahas. Eelnevalt oli teada, et miR-146a ekspressioon on keratinotsüütides indutseeritav läbi NF- κ B-sõltuva mehhanismi vastusena paljudele immuunsüsteemi aktiveerjatele nagu LPS, IL-1 β , LMP1 ja TNF- α (Meisgen *et al.*, 2014; Rebane *et al.*, 2014). miR-146b ekspressiooniks on vaja aktiveerida JAK-STAT sõltuv signaalirada (Curtale *et al.*, 2013). STAT transkriptsioonifaktorite liikumist tuuma reguleerivad paljud põletikku soodustavad tsütokiinid nagu IL-6 ja IFN- γ ja samuti põletikku alla suruv tsütokiin IL-10 (Xiang *et al.*, 2014; Darnell Jr., 1997). Käesolevas töös kinnitati, et miR-146a ekspressioon on indutseeritav TNF- α , IL-1 β ja IL-17A toimel ning näidati, et miR-146b ekspressioon tõusis IFN- γ ja IL-1 β mõjul. Need tsütokiinid on psoriaasi patsientide lööbelises nahas kõrgema ekspressiooniga ja osalevad psoriaasi patogeneesis (Baliwag *et al.*, 2015). Sellest tulenevalt võib arvata, et nimetatud tsütokiinid põhjustavad ka psoriaasi patsientide lööbelises nahas miR-146a/b kõrgeks tõusnud ekspressiooni. Kõrgeks tõusnud miR-146a/b ekspressioon aitab tõenäoliselt alla suruda põletikku soodustavate tsütokiinide sünteesi psoriaasi löövetes, kuid ei ole siiski piisav põletiku täielikuks allasurumiseks.

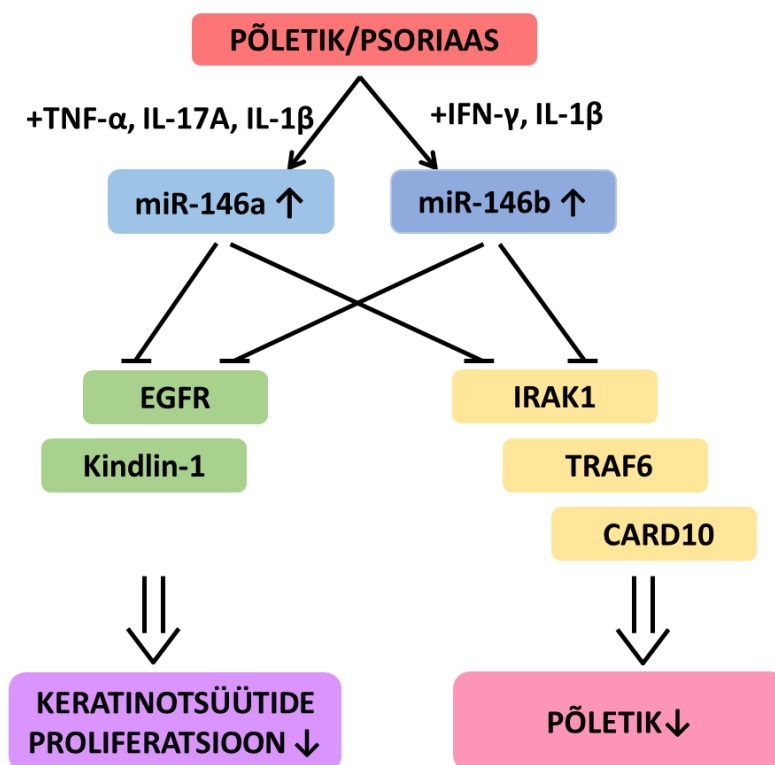
Kindlin-1 kõrgeks tõusnud ekspressioon on eelnevalt leitud kopsukasvajate ning mitmetes sinna metastaseeruvates kasvajates näiteks jämesoole- ja põiekasvajate puhul. Samuti tuvastati kõrgeks tõusnud Kindlin-1 ekspressioon invasiivsetes ja metastaase soodustavates inimese vähirakuliinides MDA-MB-231 ja MDA-MB-468, kus leiti, et tugevam Kindlin-1 ekspressioon soodustabki proliferatsiooni ja rakkude kiiremat migratsiooni (Sin *et al.*, 2011). Eelnevalt on näidatud, et rinnaepiteeli rakuliinides soodustas Kindlin-1 ekspressiooni TGF- β (*Transforming growth factor beta*) (Kloeker *et al.*, 2003). Keratinotsüütides põhjustas Kindlin-1 kõrgeks tõusnud ekspressiooni tsütokiinid IFN- γ ja TNF- α , millest võib järeldada, et need tsütokiinid vähemalt osaliselt vastutavad suurenenud Kindlin-1 ekspressiooni eest psoriaasi patsientide terves ja lööbelises nahas. Kindlin-1 suurenenud ekspressioon psoriaasis näitab tema võimalikku funktsiooni keratinotsüütide hüperproliferatsioonis.

Zheng jt töös tuvastati, et miR-146a reguleerib keratinotsüütide proliferatsiooni kuna inhibeerib EGFR-i, mis on keratinotsüütide proliferatsiooni positiivne regulaator (Zhang *et al.*, 2014). Antud uurimuses tuvastati, et nii miR-146a kui ka miR-146b vähendavad keratinotsüütide proliferatsiooni. Varasemad uurimused on näidanud, et erinevad miRNA-d, mis aeglustavad keratinotsüütide proliferatsiooni, mõjutavad tihti ka rakutsükli inhibeerides CDK-sid, erinevaid tsükliine või E2F perekonna valke otseselt või kaudselt. Ühe näitena võib välja tuua, et miR-483-3p inhibeerib keratinotsüütide proliferatsiooni kuna põhjustab rakutsükli peatumise G1-faasis selle tõttu, et miR-483-3p sihtmärgiks on CDK-sid aktiveeriv fosfataas CDC24A (Bertero *et al.*, 2013). Seetõttu oleks võinud arvata, et muutunud proliferatsiooni kiirus kajastub ka keratinotsüütide rakutsükli. Uurisime miR-146a/b mõju keratinotsüütide rakutsükli, aga ei tuvastanud märkimisväärsed muutusi rakkude jaotuses eri rakutsükli faaside vahel. See võib tuleneda asjaolust, et miR-146a/b sihtmärkgeenid ei osale rakutsükli reguleerimisel vaid mõjutavad keratinotsüütide proliferatsiooni teiste mehhanismide kaudu. Samuti on võimalik, et kasutatud DAPI-põhine meetod ei olnud piisavalt tundlik muutuste leidmiseks mittesünkroniseeritud keratinotsüütide rakutsükli.

Lisaks geeniekspressiooni kiibi andmetele (Rebane *et al.*, 2014), aitas Kindlin-1, kui potentsiaalset miR-146a/b sihtmärki tuvastada TargetsCan 6.2-s teostatud analüüs, mille tulemusel leiti kaks miR-146a/b seondumissaiti Kindlin-1 geeni 3' UTR-is. Töös tuvastati, et miR-146a/b suruvad alla Kindlin-1 ekspressiooni tugevamini stimuleerimata keratinotsüütides nii mRNA kui ka valgu tasemel. Kuna on Kindlin-1 on proliferatsiooni võimendav valk, siis võib oletada, et miR-146a/b mõju keratinotsüütide proliferatsioonile võib olla osaliselt vahendatud läbi Kindlin-1 inhibeerimise rakkudes. Lisaks võivad miR-146a/b mõjutada keratinotsüütide proliferatsiooni läbi eelnevalt näidatud miR-146a märklaua EGFR inhibeerimise (Zhang *et al.*, 2014).

Varasemalt on näidatud, et miR-146a/b suruvad alla keratinotsüütide aktivatsiooni läbi NF- κ B signaaliraja inhibeerimise (Meisgen *et al.*, 2014; Rebane *et al.*, 2014). Käesolev töö näitab, et miR-146a/b vähendavad ka keratinotsüütide proliferatsiooni, ning seda tõenäoliselt osaliselt läbi proliferatsiooni võimendava valgu Kindlin-1 ekspressiooni inhibeerimise. Järelikult võib oletada, et miR-146a/b suurenenud ekspressioon psoriaasi haigete nahas aitab tasakaalustada põletikulisi protsesse ning vähendab ka keratinotsüütide hüperproliferatsiooni. Joonis 13 esitab kokkuvõtlikult käesoleva ja varasemate tööde põhjal välja pakutud mudeli miR-146a/b oletatavatest

funktsioonidest psoriaasihaigete nahas. Täpsemaks välja selgitamiseks kui olulised on miR-146a/b psoriaasis, on vajalikud edasised uuringud. Näiteks võimaldaks hiire psoriaasi mudeli (van der Fits *et al.*, 2009) rakendamine võrdlevalt metsiktüüpi ja transgeensetele hiirtele, kellel puudub kas miR-146a, miR-146b või mõlemad, uurida paremini kui olulised on miR-146a/b psoriaasis. miR-146a/b üleekspressiooni katsed *in vivo* hiire psoriaasi mudelis aitaksid omakorda aru saada, kas miR-146a/b ekspressiooni indutseerimine või eksogeenne lisamine omaks ravimiarenduslikku potentsiaali psoriaasi korral.



Joonis 13. miR-146a/b regulatsioon ja funktsioonid psoriaasihaigete nahas. Põletikuliste protsesside tõttu psoriaasi haigete nahas suureneb tsütokiinide IFN- γ , TNF- α , IL-1 β ja IL-17A hulk, mis põhjustavad miR-146a/b kõrgekspressiooni. miR-146a/b kõrgem ekspressioon inhibeerib miR-146a/b sihtmärkgeenid, mille hulka kuuluvad proliferatsiooni positiivsed regulaatorid EGFR ja Kindlin-1, aga ka sihtmärgid IRAK1, TRAF6 ja CARD10 NF- κ B signaalirajalt (Taganov *et al.*, 2006; Meisgen *et al.*, 2014; Rebane *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2014). Selle tulemusel aeglustub keratinotsüütide proliferatsiooni kiirus ja väheneb põletik.

KOKKUVÕTE

Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus, mille üheks iseloomulikuks tunnuseks on keratinotsüütide hüperproliferatsioon nahas. Käesolevas töös uuriti miR-146a/b ja Kindlin-1 ekspressiooni psoriaasi patsientide nahas, ekspressiooni regulatsiooni keratinotsüütides ja miR-146a/b mõju keratinotsüütide proliferasioonile. Leiti miR-146a/b kõrgeenenud ekspressioon psoriaasi patsientide lööbelises nahas ning kõrgeenenud Kindlin-1 mRNA ekspressioon psoriaasi patsientide kontrollnahas ja lööbelises nahas. Kindlin-1 ekspressiooni täpsemaks kirjeldamiseks tehti immunofluorestsentsanalüüs, mille tulemusel nähti kõrgeenenud Kindlin-1 valgu ekspressiooni psoriaasi patsientide lööbelise naha basaalkihi keratinotsüütides. Epidermise diferentseerumist psoriaasi patsientide nahas hinnati KRT10 valgu ekspressiooni alusel. Kirjanduse ülevaates kirjeldati Kindlin-1 rolli keratinotsüütide proliferasioonis, millest tulenevalt järeldati, et kõrgeenenud Kindlin-1 ekspressioon psoriaasis võib põhjustada haigusele omast keratinotsüütide hüperproliferatsiooni.

Töös tuvastati samuti, et miR-146a ekspressioon on indutseeritav TNF- α , IL-1 β ja IL-17A poolt keratinotsüütides. miR-146b ekspressiooni taset tõstsid IFN- γ ja IL-1 β . Kindlin-1 ekspressiooni indutseerisid tsütokiinid IFN- γ ja TNF- α . Kõik nimetatud tsütokiinid on samuti kõrgema ekspressiooniga psoriaasi patsientide lööbelises nahas ja mõjutavad ühel või teisel moel psoriaasi teket ja kulgu (Baliwag *et al.*, 2015). Seepärast võib oletada, et nimetatud tsütokiinid on vähemalt osaliselt vastutavad miR-146a/b ning Kindlin-1 kõrgema ekspressiooni eest psoriaasi patsientide lööbelises nahas. Teadaolevalt on miR-146a/b funktsioon maha suruda liigset immuunvastust põletikulistes protsessides, aga on võimalik, et tal on muid rolle psoriaasi patsientide lööbelises nahas. Seetõttu uuriti kas miR-146a/b mõjutavad keratinotsüütide proliferasiooni. Leiti, et miR-146a/b vähendavad keratinotsüütide proliferasiooni kiirust umbes 30%. Võib oletada, et nii terves nahas kui ka psoriaasis on miR-146a/b üheks funktsiooniks piirata keratinotsüütide liigset proliferasiooni.

Meie laboris teostatud geeniekspressiooni kiibi abil oli näidatud, et Kindlin-1 ekspressioon on inhibeeritud miR-146a poolt (Rebane *et al.*, 2014). Lisaks on Targetscan 6.2 ennustuse järgi miR-146a/b-l kaks Kindlin-1 seondumissaiti. Geenikiibi tulemuste kinnitamiseks, uuriti miR-146a/b üleekspressiooni mõju Kindlin-1 endogeensele ekspressioonile ja nähti, et

miR-146a/b vähendab Kindlin-1 mRNA hulka mittestimuleeritud keratinotsüütides ja IFN- γ stimuleeritud rakkudes. Kindlin-1 taseme langus miR-146a/b üleekspressioonil mittestimuleeritud keratinotsüütides tuvastati ka valgu tasemel, mille alusel võib arvata, et Kindlin-1 on miR-146a/b sihtmärk inimese primaarsetes keratinotsüütides.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva magistritöö tulemused, et miR-146a/b ja nende märklaudvalgu Kindlin-1 ekspressioon on kõrgeenenud psoriaasihaigete nahas ning see omakorda võib mõjutada psoriaasiga seotud põletikulisi protsesse ja keratinotsüütide hüperproliferatsiooni. Et täpsemalt välja selgitada, kui olulised on miR-146a/b psoriaasis ning kas miR-146a/b ekspressiooni moduleerimist võiks kasutada ühe lähenemisena psoriaasi teraapias, on vaja jätkata uurimistööd.

The role of miR-146a and miR-146b in psoriasis and keratinocyte proliferation

Helen Hermann

SUMMARY

Psoriasis is an inflammatory skin disease that is associated with changes in epidermal proliferation and differentiation (Lowes *et al.*, 2007). Gene expression modulators, including miRNAs influencing the regulation of inflammatory responses and keratinocyte proliferation, might potentially influence the development of psoriasis.

microRNA families often consist of multiple members that function in post-transcriptional regulation of the same or overlapping set of genes. The miR-146 family consists of two members, miR-146a and miR-146b (miR-146a/b), encoded by two independent genes located on chromosomes 5 and 10 in humans, respectively. Mature miR-146a/b differ from each other in two nucleotides and they both most likely target the same or very similar set of genes, because of the identical seed sequence (Taganov *et al.*, 2006).

The aim of this study was to analyze the expression of miR-146a/b and their putative target, Kindlin-1, in psoriatic skin and to assess miR-146a/b role in proliferation of keratinocytes. We confirmed the up-regulation miR-146a/b expression in lesional skin of psoriasis patients and show first time increased expression of proliferation-related Kindlin-1 mRNA in lesional and non-lesional skin of psoriasis patients. Second, we analyzed the role of miR-146a/b in the regulation of keratinocyte proliferation and observed that overexpression of miR-146a/b decreased keratinocyte proliferation by about 30% in unstimulated keratinocytes.

Finally, we confirmed that miR-146a/b suppress the expression of proliferation related target Kindlin-1 on mRNA and protein level in unstimulated keratinocytes. Our results together suggest that Kindlin-1 is a novel factor that might contribute to the hyperproliferation of keratinocytes in psoriatic skin and demonstrate that in addition to their anti-inflammatory function, miR-146a/b inhibit the proliferation of keratinocytes, and thereby might control homeostasis of healthy skin and have auxiliary impact in psoriasis.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tänan oma juhendajaid Ana Rebast, Toomas Runnelit ja Toivo Maimetsa. Suurimad tänusõnad Ana Rebasele, kes oli minu suurim toetaja ja nõustaja sellel projektil. Samuti tänan teisi RNA bioloogia uurimisgrupi liikmeid, kes abistasid mind minu töös, eriti Egon Urgardit, Merit Müüri ja Alar Aabi. Lisaks tootsin välja Kai Kisandi ja Dmitri Lubenetsi, kes abistasid mind läbivoolutsütomeetria läbiviimisel ja tulemuste analüüsimisel. Samuti tootsin välja Tartu Ülikooli Nahahaiguste kliiniku töötajad, kes kogusid psoriaasi patsientide ja tervete kontrollide naha proovid ning Ele Pransi ja Liisi Šahmatova, kes tegelesid RNA eraldamisega antud proovidest. Tänan Julia Maslovskajat ja Maire Pihlapit, kes abistasid mind tehniliste küsimustega. Tänan oma perekonda, kes on mind õpingute ajal toetanud.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J., Knaus, U. G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1:533–40.
2. Austin, L., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. and Krueger, J. (1999). The Majority of Epidermal T Cells in Psoriasis Vulgaris Lesions can Produce Type 1 Cytokines, Interferon- γ , Interleukin-2, and Tumor Necrosis Factor- α , Defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 Effector Populations:1 a Type 1 Differentiation Bias is also Measured in Circulating Blood T Cells in Psoriatic Patients. *J Invest Dermatol*, 113(5), pp.752-759.
3. Backendorf, C., Hohl, D., (1992). A common origin for cornified envelope proteins? *Nat. Genet.* 2, 91.
4. Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y., Collart, M. A., Liu, H., Denis C. L. (1999). The CCR4 and CAF1 Proteins of the CCR4-NOT Complex Are Physically and Functionally Separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol Cell Biol.* Oct; 19(10): 6642–6651.
5. Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L., Hart, R. and Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA*, 16(5), pp.1032-1039.
6. Baliwag, J., Barnes, D. and Johnston, A. (2015). Cytokines in psoriasis. *Cytokine*, S1043-4666(14)00628-0
7. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), pp.215-233.
8. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14), pp.1885-1898.
9. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
10. Bertero, T., Gastaldi, C., Bourget-Ponzio, I., Mari, B., Meneguzzi, G., Barbry, P., Ponzio, G. and Rezzonico, R. (2013). CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND–CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell Death and Differentiation*, 20(6), pp.800-811.
11. Bohnsack, M., Czaplinski, K., Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), pp.185-191.
12. Boldin, M., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Baltimore, D. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 208 (6), 1189–1201.

13. Boniface, K., Bernard, F., Garcia, M., Gurney, A., Lecron, J. and Morel, F. (2005). IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 174(6), pp.3695-3702.
14. Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F., Nau, F., Guillet, G., Dagregorio, G., Yssel, H., Lecron, J. and Morel, F. (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clinical & Experimental Immunology*, 150(3), pp.407-415.
15. Bowcock, A. and Krueger, J. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews Immunology*, 5(9), pp.699-711.
16. Breeden, L. L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Current Biology*. 13(1):R31-8.
17. Brightbill, H., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., Modlin, R. L. (1999). Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science*, 285(5428), pp.732-736.
18. Bueno, M., de Castro, I. and Malumbres, M. (2008). Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*, 7(20), pp.3143-3148.
19. Cai, X., Hagedorn, C. H., Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), pp.1957-1966.
20. Cai, Y., Fleming, C. and Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol Immunol*, 9(4), pp.302-309.
21. Cameron, J., Yin, Q., Fewell, C., Lacey, M., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., Schaefer, B. and Flemington, E. (2007). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Cellular MicroRNA miR-146a, a Modulator of Lymphocyte Signaling Pathways. *Journal of Virology*, 82(4), pp.1946-1958.
22. Capon, F., Trembath, R.C., Barker, J.N. (2004). An update on the genetics of psoriasis. *Dermatol. Clin.* 22, 339–347, vii.
23. Cargill, M., Schrodi, S., Chang, M., Garcia, V., Brandon, R., Callis, K., Matsunami, N., Ardlie, K., Civello, D., Catanese, J., Leong, D., Panko, J., McAllister, L., Hansen, C., Papenfuss, J., Prescott, S., White, T., Leppert, M., Krueger, G. and Begovich, A. (2007). A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to the Identification of IL23R as Psoriasis-Risk Genes. *The American Journal of Human Genetics*, 80(2), pp.273-290.
24. Caruso, R., Botti, E., Sarra, M., Esposito, M., Stolfi, C., Diluvio, L., Giustizieri, M., Pacciani, V., Mazzotta, A., Campione, E., MacDonald, T., Chimenti, S., Pallone, F., Costanzo, A. and Monteleone, G. (2009). Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nat Med*, 15(9), pp.1013-1015.

25. Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Nogales, K., Tian, S., Cardinale, I., Chimenti, S. and Krueger, J. (2011). Integrative Responses to IL-17 and TNF- α in Human Keratinocytes Account for Key Inflammatory Pathogenic Circuits in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 131(3), pp.677-687.
26. Crone, S., Jacobsen, A., Federspiel, B., Bardram, L., Krogh, A., Lund, A. and Friis-Hansen, L. (2012). microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 11(1), p.71.
27. Curtale, G., Mirolo, M., Renzi, T., Rossato, M., Bazzoni, F. and Locati, M. (2013). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), pp.11499-11504.
28. Darnell Jr., J. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), pp.1630-1635.
29. Diederichs, S. and Haber, D. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell*, 131(6), pp.1097-1108.
30. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*, 10(8), pp.857-863.
31. Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, 132(1), pp.9-14.
32. Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S., Schmidt-Weber, C. and Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation*.
33. Fan, X., Yang, S., Huang, W., Wang, Z.M., Sun, L.D., Liang, Y.H., Gao, M., Ren, Y.Q., Zhang, K.Y., Du, W.H., Shen, Y.J., Liu, J.J., Zhang, X.J. (2008). Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. *PLoS Genet*. 4, e1000038.
34. Feng, T., Xu, D., Tu, C., Li, W., Ning, Y., Ding, J., Wang, S., Yuan, L., Xu, N., Qian, K., Wang, Y. and Qi, C. (2015). miR-124 inhibits cell proliferation in breast cancer through downregulation of CDK4. *Tumor Biology*.
35. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 2008(2), pp.102-114.
36. Friedrich, M., Krammig, S., Henze, M., Docke, W. D., Sterry, W., Asadullah, K. (2000). Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type 1 immunophenotype. *Arch Dermatol Res*; 292: 519–521.

37. Gearing, A., Fincham, N. J., Bird, C. R., Wadhwa, M., Meager, A., Cartwright, J. E., Camp, R. D. (1990). Cytokines in skin lesions of psoriasis. *Cytokine*, 2(1), pp.68-75.
38. Gervin, K., Vigeland, M. D., Mattingsdal, M., Hammero, M., Nygard, H., Olsen, A. O., Brandt, I., Harris, J. R., Undlien, D. E., Lyle, R., (2012). DNA methylation and gene expression changes in monozygotic twins discordant for psoriasis: identification of epigenetically dysregulated genes. *PLoS Genet.* 8, e1002454.
39. Grimson, A., Farh, K., Johnston, W., Garrett-Engele, P., Lim, L. and Bartel, D. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, 27(1), pp.91-105.
40. Gupta, R., Debbaneh, M. and Liao, W. (2014). Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Derm Rep*, 3(1), pp.61-78.
41. Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, I. G., Dargemont, C. (2002). Exportin-5 Mediates Nuclear Export of Mini-helix-containing RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), pp.5505-5508.
42. Hammond, S., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science*, 293(5532), pp.1146-1150.
43. Han, J. Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24), pp.3016-3027.
44. Hartupée, J., Liu, C., Novotny, M., Li, X. and Hamilton, T. (2007). IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization. *The Journal of Immunology*, 179(6), pp.4135-4141.
45. Has, C., Herz, C., Zimina, E., Qu, H., He, Y., Zhang, Z., Wen, T., Gache, Y., Aumailley, M. and Bruckner-Tuderman, L. (2009). Kindlin-1 Is Required for RhoGTPase-Mediated Lamellipodia Formation in Keratinocytes. *The American Journal of Pathology*, 175(4), pp.1442-1452.
46. Hatziapostolou, M., Polytarchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultsides, G., Jaeger, S., Ogata, H., Karin, M., Struhl, K., Hadzopoulou-Cladaras, M. and Iliopoulos, D. (2011). An HNF4 α -miRNA Inflammatory Feedback Circuit Regulates Hepatocellular Oncogenesis. *Cell*, 147(6), pp.1233-1247.
47. Heinemann, A., He, Y., Zimina, E., Boerries, M., Busch, H., Chmel, N., Kurz, T., Bruckner-Tuderman, L. and Has, C. (2011). Induction of phenotype modifying cytokines by FERMT1 mutations. *Hum. Mutat*, 32(4), pp.397-406.
48. Herz, C., Aumailley, M., Schulte, C., Schlotzer-Schrehardt, U., Bruckner-Tuderman, L. and Has, C. (2006). Kindlin-1 Is a Phosphoprotein Involved in Regulation of Polarity, Proliferation, and Motility of Epidermal Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), pp.36082-36090.
49. Hsu, Y., Li, L. and Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*, 20(8), pp.847-856.

50. Hu, H., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y., Chen, W. and Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10(1), p.413.
51. Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12(2), pp.99-110.
52. Iliopoulos, D., Hirsch, H. and Struhl, K. (2009). An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell*, 139(4), pp.693-706.
53. Ipsaro, J. and Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 22(1), pp.20-28.
54. Jackson, S., Zhang, Z., Feng, D., Flagg, M., O'Loughlin, E., Wang, D., Stokes, N., Fuchs, E. and Yi, R. (2013). Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development*, 140(9), pp.1882-1891.
55. Jensen, U.B., Lowell, S. & Watt, F.M. (1999). The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126, 2409–2418
56. Jobard, F., Bouadjar, B., Caux, F., Hadj-Rabia, S., Has, C., Matsuda, F., Weissenbach, J., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., Fischer, J. (2003). Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Human Molecular Genetics*, 12(8), pp.925-935.
57. Johnston, A., Fritz, Y., Dawes, S., Diaconu, D., Al-Attar, P., Guzman, A., Chen, C., Fu, W., Gudjonsson, J., McCormick, T. and Ward, N. (2013). Keratinocyte Overexpression of IL-17C Promotes Psoriasiform Skin Inflammation. *The Journal of Immunology*, 190(5), pp.2252-2262.
58. Johnston, A., Guzman, A., Swindell, W., Wang, F., Kang, S. and Gudjonsson, J. (2014). Early tissue responses in psoriasis to the antitumour necrosis factor- α biologic etanercept suggest reduced interleukin-17 receptor expression and signalling. *Br J Dermatol*, 171(1), pp.97-107.
59. Jones, P. and Watt, F. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73(4), pp.713-724.
60. Joyce, C. E., Zhou, X., Xia, J., Ryan, C., Thrash, B., Menter, A., Bowcock, A. M. (2011). Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Human Molecular Genetics*, 20(20), 4025–4040.
61. Kagami, S., Rizzo, H., Lee, J., Koguchi, Y. and Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 130(5), pp.1373-1383.

62. Katakowski, M., Zheng, X., Jiang, F., Rogers, T., Szalad, A. and Chopp, M. (2010). MiR-146b-5p Suppresses EGFR Expression and Reduces In Vitro Migration and Invasion of Glioma. *Cancer Investigation*, 28(10), pp.1024-1030.
63. Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115(2), pp.209-216.
64. Kloecker, S., Major, M. B., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H., Jones, D. A., Beckerle, M. C. (2003). The Kindler Syndrome Protein Is Regulated by Transforming Growth Factor- and Involved in Integrin-mediated Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp.6824-6833.
65. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.485-517.
66. Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*.
67. Kryczek, I., Bruce, A., Gudjonsson, J., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T., Elder, J. and Zou, W. (2008). Induction of IL-17+ T Cell Trafficking and Development by IFN- γ : Mechanism and Pathological Relevance in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 181(7), pp.4733-4741.
68. Kupper, T., Ballard, D. W., Chua, A. O., McGuire, J. S., Flood, P. M., Horowitz, M. C. (1986). Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine*, 164(6), pp.2095-2100.
69. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), pp.853-858.
70. Lai, E. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 30(4), pp.363-364.
71. Lai-Cheong, J. and McGrath, J. (2010). Kindler Syndrome. *Dermatologic Clinics*, 28(1), pp.119-124.
72. Lai-Cheong, J., Parsons, M., Tanaka, A., Ussar, S., South, A., Gomathy, S., Mee, J., Barbaroux, J., Techanukul, T., Almaani, N., Clements, S., Hart, I. and McGrath, J. (2009). Loss-of-Function FERMT1 Mutations in Kindler Syndrome Implicate a Role for Fermitin Family Homolog-1 in Integrin Activation. *The American Journal of Pathology*, 175(4), pp.1431-1441.
73. Lal, A., Navarro, F., Maher, C., Maliszewski, L., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K., Gorospe, M., Hide, W. and Lieberman, J. (2009). miR-24 Inhibits Cell Proliferation by Targeting E2F2, MYC, and Other Cell-Cycle Genes via Binding to "Seedless" 3' UTR MicroRNA Recognition Elements. *Molecular Cell*, 35(5), pp.610-625.
74. Langley, R., Elewski, B., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C., Papp, K., Puig, L., Nakagawa, H., Spelman, L., Sigurgeirsson, B., Rivas, E., Tsai, T., Wasel, N., Tying, S., Salko, T., Hampele, I.,

- Notter, M., Karpov, A., Helou, S. and Papavassilis, C. (2014). Secukinumab in Plaque Psoriasis — Results of Two Phase 3 Trials. *New England Journal of Medicine*, 371(4), pp.326-338.
75. Larjava, H., Plow, E. and Wu, C. (2008). Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell–matrix adhesion. *EMBO Rep*, 9(12), pp.1203-1208.
 76. Lau, N. Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), pp.858-862.
 77. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Kim, S. and Kim, V. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415-419.
 78. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S. and Kim, V. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), pp.4051-4060.
 79. Lena, A. M., Shalom-Feuerstein, R, P Rivetti di Val Cervo, Aberdam, D, Knight, R. A., Melino, G, Candi, E. (2008). miR-203 represses ‘stemness’ by repressing Δ Np63. *Cell Death and Differentiation*, 15(7), 1187–1195.
 80. Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D. and Banerjee, S. (2012). Anti–Interleukin-17 Monoclonal Antibody Ixekizumab in Chronic Plaque Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 366(13), pp.1190-1199.
 81. Lewis, B., Burge, C. and Bartel, D. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120(1), pp.15-20.
 82. Li, B., Tsoi, L., Swindell, W., Gudjonsson, J., Tejasvi, T., Johnston, A., Ding, J., Stuart, P., Xing, X., Kochkodan, J., Voorhees, J., Kang, H., Nair, R., Abecasis, G. and Elder, J. (2014). Transcriptome Analysis of Psoriasis in a Large Case–Control Sample: RNA-Seq Provides Insights into Disease Mechanisms. *J Invest Dermatol*, 134(7), pp.1828-1838.
 83. Li, W., Zhou, B.R., Hua, L.J., Guo, Z., Luo, D. (2013). Differential miRNA profile on photoaged primary human fibroblasts irradiated with ultraviolet A. *Tumour Biol*. 34, 3491–3500.
 84. Liang, L. and He, X. (2011). Macro-management of microRNAs in cell cycle progression of tumor cells and its implications in anti-cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 32(11), pp.1311-1320.
 85. Lonnberg, A.S., Skov, L., Skytthe, A., Kyvik, K.O., Pedersen, O.B., Thomsen, S.F. (2013). Heritability of psoriasis in a large twin sample. *Br. J. Dermatol*. 169, 412–416.
 86. Lowes, M., Bowcock, A. and Krueger, J. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130), pp.866-873.
 87. Lowes, M., Chamian, F., Abello, M., Fuentes-Duculan, J., Lin, S., Nussbaum, R., Novitskaya, I., Carbonaro, H., Cardinale, I., Kikuchi, T., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Wittkowski, K., Papp, K., Garovoy, M., Dummer, W., Steinman, R. and Krueger, J. (2005). Increase in TNF- and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), pp.19057-19062.

88. Lowes, M., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L., Haider, A., Bowman, E. and Krueger, J. (2008). Psoriasis Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells. *J Invest Dermatol*, 128(5), pp.1207-1211.
89. Lu, L., Boldin, M., Chaudhry, A., Lin, L., Taganov, K., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D. and Rudensky, A. (2010). Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*, 142(6), pp.914-929.
90. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), pp.95-98.
91. Ma, Y., Qin, J., Wu, C. and Plow, E. (2008). Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of 3 integrins. *The Journal of Cell Biology*, 181(3), pp.439-446.
92. MacRae, I., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., Doudna, J. A. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311(5758), pp.195-198.
93. Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001). Milestones in cell division to cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 1(3), pp.222-231.
94. Mansbridge, J. and Knapp, M. (1987). Changes in Keratinocyte Maturation during Wound Healing. *J Invest Dermatol*, 89(3), pp.253-263.
95. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–97.
96. Mee, J., Johnson, C., Morar, N., Burslem, F. and Groves, R. (2007). The Psoriatic Transcriptome Closely Resembles That Induced by Interleukin-1 in Cultured Keratinocytes. *The American Journal of Pathology*, 171(1), pp.32-42.
97. Meisgen, F., Xu Landén, N., Wang, A., Réthi, B., Bouez, C., Zuccolo, M., Gueniche, A., Ståhle, M., Sonkoly, E., Breton, L. and Pivarcsi, A. (2014). MiR-146a Negatively Regulates TLR2-Induced Inflammatory Responses in Keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 134(7), pp.1931-1940.
98. Meisgen, F., Xu, N., Wei, T., Janson, P. C., Obad, S., Broom, O., Sonkoly, E. (2012). MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Experimental Dermatology*, 21(4), 312–314.
99. Miller, L. (2008). Toll-Like Receptors in Skin. *Advances in Dermatology*, 24, pp.71-87.
100. Mischke, D., Korge, B.P., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A. (1996). Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex (epidermal differentiation complex) on human chromosome 1q21. *J. Invest. Dermatol.* 106, 989–992.
101. Morgan, D. (1997). Cyclin-Dependent Kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13(1), pp.261-291.
102. Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M. and Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for

- integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med*, 14(3), pp.325-330.
103. Nair, R.P., Stuart, P., Henseler, T., Jenisch, S., Chia, N.V., Westphal, E., Schork, N.J., Kim, J., Lim, H.W., Christophers, E., Voorhees, J.J., Elder, J.T. (2000). Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1833–1844.
 104. Nair, R.P., Stuart, P.E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N.V., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G.R., Lim, H.W., Christophers, E., Voorhees, J.J., Elder, J.T. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 827–851.
 105. Natsuaki, Y., Egawa, G., Nakamizo, S., Ono, S., Hanakawa, S., Okada, T., Kusuba, N., Otsuka, A., Kitoh, A., Honda, T., Nakajima, S., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., Ishii, K., Tsutsui, H., Yagita, H., Iwakura, Y., Kubo, M., Ng, L., Hashimoto, T., Fuentes, J., Guttman-Yassky, E., Miyachi, Y. and Kabashima, K. (2014). Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*, 15(11), pp.1064-1069.
 106. Nograles, K. E., Zaba, L. C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suarez-Farinas, M., Cardinale, I., *et al.* Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; 159:1092-102
 107. Oh, C., Das, K. and Gottlieb, A. (2000). Treatment with anti-tumor necrosis factor α (TNF- α) monoclonal antibody dramatically decreases the clinical activity of psoriasis lesions. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(5), pp.829-830.
 108. Okada, C., Yamashita, E., Lee, S., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y. and Tsukihara, T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science*, 326(5957), pp.1275-1279.
 109. Papp, K., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J., Krueger, J., Kricorian, G., Aras, G., Li, J., Russell, C., Thompson, E. and Baumgartner, S. (2012). Brodalumab, an Anti–Interleukin-17–Receptor Antibody for Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 366(13), pp.1181-1189.
 110. Parisi, R., Symmons, D., Griffiths, C. and Ashcroft, D. (2013). Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*, 133(2), pp.377-385.
 111. Park, J., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D., Chang, H., Jee, D., Patel, D. and Kim, V. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), pp.201-205.
 112. Pasparakis, M., Haase, I. and Nestle, F. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), pp.289-301.
 113. Patel, H., Zich, J., Serrels, B., Rickman, C., Hardwick, K., Frame, M. and Brunton, V. (2013). Kindlin-1 regulates mitotic spindle formation by interacting with integrins and Plk-1. *Nat Comms*, 4.

114. Pedersen, O.B., Svendsen, A.J., Ejstrup, L., Skytthe, A., Junker, P. (2008). On the heritability of psoriatic arthritis disease concordance among monozygotic and dizygotic twins. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1417–1421.
115. Perry, M., Moschos, S., Williams, A., Shepherd, N., Larner-Svensson, H. and Lindsay, M. (2008). Rapid Changes in MicroRNA-146a Expression Negatively Regulate the IL-1 -Induced Inflammatory Response in Human Lung Alveolar Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 180(8), pp.5689-5698.
116. Piao, X., Zhang, X., Wu, L. and Belasco, J. (2010). CCR4-NOT Deadensylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6), pp.1486-1494.
117. Pittelkow, M. (2005). Psoriasis: more than skin deep. *Nat Med*, 11(1), pp.17-18.
118. Pivarcsi, A., Stähle, M., & Sonkoly, E. (2014). Genetic polymorphisms altering microRNA activity in psoriasis - a key to solve the puzzle of missing heritability? *Experimental Dermatology*, 23(9), 620–624.
119. Qu, H., Wen, T., Pesch, M. and Aumailley, M. (2012). Partial Loss of Epithelial Phenotype in Kindlin-1–Deficient Keratinocytes. *The American Journal of Pathology*, 180(4), pp.1581-1592.
120. Raghavan, S., Bauer, C., Mundschau, G., Li, Q. and Fuchs, E. (2000). Conditional Ablation of 1 Integrin in Skin: Severe Defects in Epidermal Proliferation, Basement Membrane Formation, and Hair Follicle Invagination. *The Journal of Cell Biology*, 150(5), pp.1149-1160.
121. Rebane, A., Runnel, T., Aab, A., Maslovskaja, J., Rückert, B., Zimmermann, M., Plaas, M., Kärner, J., Treis, A., Pihlap, M., Haljasorg, U., Hermann, H., Nagy, N., Kemeny, L., Erm, T., Kingo, K., Li, M., Boldin, M. and Akdis, C. (2014). MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), pp.836-847.e11.
122. Reverte, C., Benware, A., Jones, C. and LaFlamme, S. (2006). Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, 174(4), pp.491-497.
123. Robb, G. and Rana, T. (2007). RNA Helicase A Interacts with RISC in Human Cells and Functions in RISC Loading. *Molecular Cell*, 26(4), pp.523-537.
124. Rodriguez, A. Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*, 14(10a), pp.1902-1910.
125. Sa, S., Valdez, P., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D. and Ouyang, W. (2007). The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 178(11), pp.7487-7487.

126. Sabat, R., Ouyang, W. and Wolk, K. (2013). Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*, 13(1), pp.21-38.
127. Sagoo, G.S., Tazi-Ahnini, R., Barker, J.W., Elder, J.T., Nair, R.P., Samuelsson, L., Traupe, H., Trembath, R.C., Robinson, D.A., Iles, M.M. (2004). Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1401–1405.
128. Schwarz, D., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2), pp.199-208.
129. Sherr, C. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73(6), pp.1059-1065.
130. Sherr, C. and Roberts, J. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), pp.1501-1512.
131. Siegel, D., Ashton, G., Penagos, H., Lee, J., Feiler, H., Wilhelmsen, K., South, A., Smith, F., Prescott, A., Wessagowit, V., Oyama, N., Akiyama, M., McLean, W., McGrath, J., Epstein, E., *et al.* (2003). Loss of Kindlin-1, a Human Homolog of the *Caenorhabditis elegans* Actin–Extracellular-Matrix Linker Protein UNC-112, Causes Kindler Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 73(1), pp.174-187.
132. Sigmundsdóttir, H., Johnston, A., Gudjónsson, J. and Valdimarsson, H. (2004). Differential effects of interleukin 12 and interleukin 10 on superantigen-induced expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) and α E β 7 integrin (CD103) by CD8⁺ T cells. *Clinical Immunology*, 111(1), pp.119-125.
133. Sin, S., Bonin, F., Petit, V., Meseure, D., Lallemand, F., Bieche, I., Bellahcene, A., Castronovo, V., de Wever, O., Gespach, C., Lidereau, R. and Driouch, K. (2011). Role of the Focal Adhesion Protein Kindlin-1 in Breast Cancer Growth and Lung Metastasis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 103(17), pp.1323-1337.
134. Smith, C. (2006). Psoriasis and its management. *BMJ*, 333(7564), pp.380-384.
135. Sonkoly, E., Ståhle, M. and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clin Exp Dermatol*, 33(3), pp.312-315.
136. Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P., Sääf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., Ståhle, M. and Pivarcsi, A. (2007). MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? *PLoS ONE*, 2(7), p.e610.
137. Steinman, L. (2007). A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell–mediated tissue damage. *Nat Med*, 13(2), pp.139-145.
138. Taganov, K., Boldin, M., Chang, K. and Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), pp.12481-12486.

139. Tang, H., Jin, X., Li, Y., Jiang, H., Tang, X., Yang, X., Cheng, H., Qiu, Y., Chen, G., Mei, J., Zhou, F., Wu, R., Zuo, X., Zhang, Y., Zheng, X., Cai, Q., Yin, X., Quan, C., Shao, H., Cui, Y., Tian, F., Chen, R., Yang, S., Wang, J., *et al.* (2014). A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nat. Genet.* 46, 45–50.
140. Trembath, R.C., Clough, R.L., Rosbotham, J.L., Jones, A.B., Camp, R.D., Frodsham, A., Browne, J., Barber, R., Terwilliger, J., Lathrop, G.M., Barker, J.N. (1997). Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum. Mol. Genet.* 6, 813–820.
141. Trifari, S., Kaplan, C., Tran, E., Crellin, N. and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol*, 10(8), pp.864-871.
142. Tsoi, L. C., Spain, S. L., Knight, J., Ellinghaus, E., Stuart, P. E., Capon, F., Heijer, M. den, Barnes, L., Campbell, L. E., Cusack, C., Coleman, C., Conroy, J., Ennis, S., Franke, A *et al.* (2012). Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nature Genetics*, 44(12), 1341–1348.
143. Tyers, M., Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current opinion in genetics & development*. Feb; 10 (1):54-64.
144. Ussar, S., Moser, M., Widmaier, M., Rognoni, E., Harrer, C., Genzel-Boroviczeny, O. and Fässler, R. (2008). Loss of Kindlin-1 Causes Skin Atrophy and Lethal Neonatal Intestinal Epithelial Dysfunction. *PLoS Genetics*, 4(12), p.e1000289.
145. van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J., Kant, M., Boon, L., Laman, J., Cornelissen, F., Mus, A., Florencia, E., Prens, E. and Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), pp.5836-5845.
146. Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. and Fuchs, E. (1999). The magical touch: Genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), pp.8551-8556.
147. Viswanathan, V. and Hecht, G. (2000). Innate immunity and the gut. *Current Opinion in Gastroenterology*, 16(6), pp.546-551.
148. Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), pp.669-687.
149. Wang, S., Olson, E. N. (2009). AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3), 205–211.
150. Ward, N. and Umetsu, D. (2014). A New Player on the Psoriasis Block: IL-17A- and IL-22-Producing Innate Lymphoid Cells. *J Invest Dermatol*, 134(9), pp.2305-2307.
151. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity:

- microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3), pp.228-234.
152. Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H., Sterry, W. and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36(5), pp.1309-1323.
 153. Wu, L., Fan, J. and Belasco, J. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), pp.4034-4039.
 154. Wuepper, K.D., Coulter, S.N., Haberman, A. (1990). Psoriasis vulgaris: a genetic approach. *J. Invest. Dermatol.* 95, 2S–4S.
 155. Xiang, M., Birkbak, N., Vafaizadeh, V., Walker, S., Yeh, J., Liu, S., Kroll, Y., Boldin, M., Taganov, K., Groner, B., Richardson, A. and Frank, D. (2014). STAT3 Induction of miR-146b Forms a Feedback Loop to Inhibit the NF- κ B to IL-6 Signaling Axis and STAT3-Driven Cancer Phenotypes. *Science Signaling*, 7(310), pp.ra11-ra11.
 156. Xu, N., Meisgen, F., Butler, L. M., Han, G., Wang, X.-J., Soderberg-Naucler, C., Sonkoly, E. (2012). MicroRNA-31 Is Overexpressed in Psoriasis and Modulates Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Keratinocytes via Targeting Serine/Threonine Kinase 40. *The Journal of Immunology*, 190(2), 678–688.
 157. Yano, S., Banno, T., Walsh, R. and Blumenberg, M. (2007). Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. *Journal of Cellular Physiology*, 214(1), pp.1-13.
 158. Yi, R, Fuchs, E. (2009). MicroRNA-mediated control in the skin. *Cell Death and Differentiation*, 17(2), 229–235.
 159. Yi, R., Poy, M., Stoffel, M. and Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing “stemness”. *Nature*, 452(7184), pp.225-229.
 160. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), pp.3011-3016.
 161. Zaba, L., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Nograles, K., Guttman-Yassky, E., Cardinale, I., Lowes, M. and Krueger, J. (2009). Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(5), pp.1022-1030.e395.
 162. Zeng, Y., Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Research*, 32(16), pp.4776-4785.
 163. Zhang, L., Stokes, N., Polak, L. and Fuchs, E. (2011). Specific MicroRNAs Are Preferentially Expressed by Skin Stem Cells To Balance Self-Renewal and Early Lineage Commitment. *Cell Stem Cell*, 8(3), pp.294-308.

164. Zhang, W., Yi, X., Guo, S., Shi, Q., Wei, C., Li, X., Gao, L., Wang, G., Gao, T., Wang, L. and Li, C. (2014). A single-nucleotide polymorphism of miR-146a and psoriasis: an association and functional study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(11), pp.2225-2234.
165. Zhang, X. and Zeng, Y. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Research*, 38(21), pp.7689-7697.
166. Zhao, J., Rao, D., Boldin, M., Taganov, K., O'Connell, R. and Baltimore, D. (2011). NF- B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), pp.9184-9189.
167. Zhu, S. and Qian, Y. (2012). IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci.*, 122(11), pp.487-511.
168. Zibert, J. R., Løvendorf, M. B., Litman, T., Olsen, J., Kaczkowski, B., & Skov, L. (2010). MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 58(3), 177–185.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa
2. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000449
3. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003129
4. http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_61/view_gene.cgi?rs=NM_017671&taxid=9606&members=miR-146ac/146b-5p&showcnc=1&shownc=1&showncf=0#miR-146ac/146b-5p

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helen Hermann
(sünnikuupäev:22.11.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „MikroRNA perekonna 146 liikmete roll proliferatsiooni regulatsioonis inimese primaarsetes keratinotsüütides ning seos psoriaasiga“,

mille juhendaja on Ana Rebane, Toomas Runnel ja Toivo Maimets,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015